生命科学实验指南系列

分子生物学实验室工作手册

At the Bench

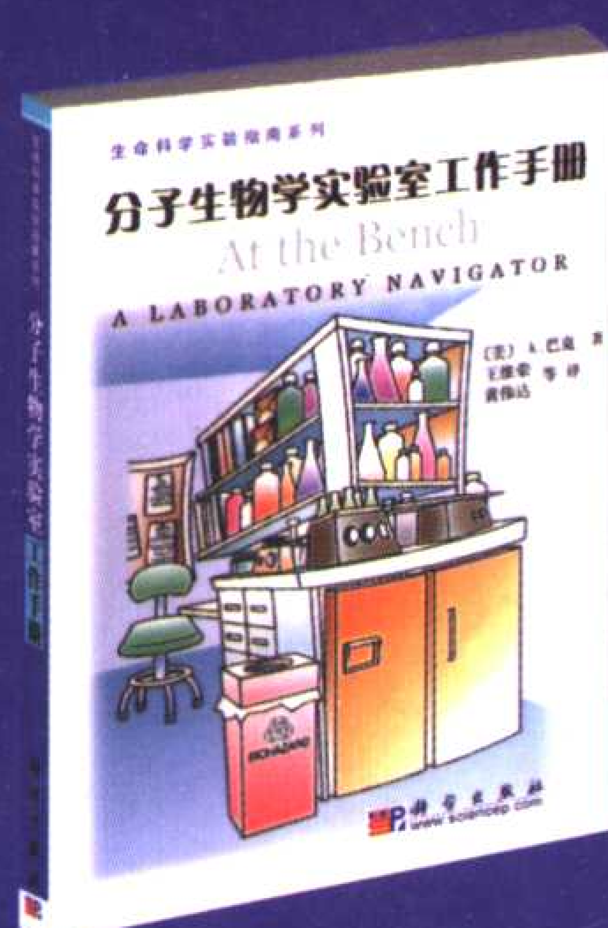
A LABORATORY NAVIGATOR

〔美〕K. 巴克 著

王维荣
黄伟达 等 译


科学出版社
www.sciencep.com

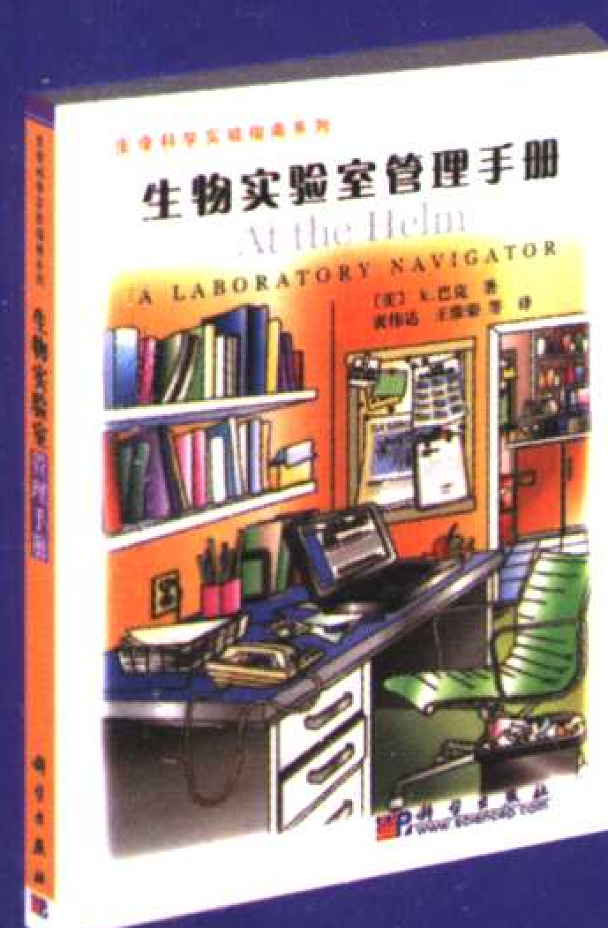
K.巴克（Kathy Barker）十分熟悉实验室的生活，她曾经是实验室技术员，在马萨诸塞州大学获得生物学学士学位和英语学士学位，后又获得微生物学的硕士和博士学位。在洛克菲勒大学作博士后期间从事病毒肿瘤学研究，并在同一所学校的细胞生理学和免疫学实验室任助理教授。她做过研究生、培训医师、技术员和指导教师等工作，丰富的实验室经历使她得以完成这两本出色的工作手册。



该书对于重点理解以下问题具有极大帮助

- 研究人员如何开展工作并如何适应？
- 什么设备是必需的且应该如何正确使用？
- 如何建立一个实验？
- 如何开始实验和组织实验？
- 如何处理和使用数据及参考文献？
- 如何介绍实验工作及实验结果？

该书指导你正确处理与实验室及实验相关的几乎一切事物，并告诉你如何避免错误的发生，以及实验室的生活和工作应该如何合理、规范、正确地进行有序计划和执行。



实验室的负责人要组建、领导研究团队，管理人事和机构，申请科研经费，同时还要出科研成果以保持学术领先地位。但是，许多实验室管理者往往缺少经营管理意识以及相应的知识储备。本书为实验室管理者提供了全面的指导，通过对众多科研管理人员的访问及相关资料的搜集，运用生动而丰富的例证，讨论了一系列管理中具有挑战性的问题以及可以促进成功的技巧。

对于所有对实验室管理和实践感兴趣的愿意思考的读者，对于教育者、管理者以及哪怕仅仅是从兴趣出发的人，这本书都是不可不读的。



销售分类建议：生物医学/分子生物学

生命科学编辑部
联系电话：010-64012501
http://www.lifescience.com.cn
e-mail:spbio@163.net

ISBN 7-03-015277-8
定 价：48.00 元

生命科学实验指南系列

分子生物学实验室工作手册

〔美〕 K.巴克 著

王维荣 黄伟达 等 译

科学出版社

北京

图字：01-2004-4053

内 容 简 介

本书是对分子生物学实验室工作的全面论述，内容涵盖实验室机构运作、软硬件配置以及实验操作过程、结果记录、数据提呈等方面，是实验室工作的指导性手册。为加强实验室的建设与管理，帮助实验室人员独立熟悉工作环境，更好地完成对实验室工作信息的收集、整理、统计与交流等方面发挥积极的作用。

本书忠实于原文，最大限度地反映了原书的风格与韵味。可作为高等院校高年级学生、研究生、实验室管理者以及分子生物学实验室工作人员的参考用书。

图书在版编目（CIP）数据

分子生物学实验室工作手册/（美）巴克（Barker, K.）著；王维荣，黄伟达等译. —北京：科学出版社，2005
（生命科学实验指南系列）
ISBN 7-03-015277-8

Ⅰ.分… Ⅱ.①巴…②王…③黄… Ⅲ.分子生物学-实验-手册 Ⅳ.Q7-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字（2005）第 040380 号

责任编辑：李 悦/责任校对：李奕萱
责任印制：钱玉芬/封面设计：王 浩
科学出版社 出版
北京东黄城根北街16号
邮政编码:100717
http://www.sciencep.com
双青印刷厂 印刷
科学出版社发行 各地新华书店经销
*
2005年8月第 一 版 开本：787×1092 1/16
2005年8月第一次印刷 印张：21 1/4
印数：1—4 000 字数：479 000

定价：48.00 元

（如有印装质量问题，我社负责调换〈环伟〉）

译 者 序

2004年科学出版社的马学海博士带来了K. 巴克的两本新书：*At The Bench—A Laboratory Navigator* 和 *At The Helm—A Laboratory Navigator*，希望我们能够翻译为中文，介绍给中国的读者，尤其是从事分子生物学和医学研究的工作者。

At The Bench—A Labloratory Navigator 一书全面系统地描述了一个实验室工作者——无论是初进实验室的“新手”或已有一定实验经验的“老手”——应该如何正确面对你的实验室、实验台、实验室主管研究人、实验同事及如何应对实验仪器设备的使用和故障处理，如何计划和进行实验并解释和陈述实验及如何面对危险与危害处理。该书指导你如何正确处理与实验室及实验相关的几乎一切事物的关系，并告诉你如何判断、处理和避免错误的发生以及所有的实验室生活和工作应该如何合理、规范、正确地进行有序计划和执行。

原书作者K. 巴克十分熟悉实验室的生活，她曾经是实验室技术员，在马塞诸塞州大学获得生物学学士学位和英语学士学位，后又获得微生物学的硕士和博士学位。在洛克菲勒大学的博士后期间从事病毒肿瘤学研究，并在同一所学校的细胞生理学和免疫学实验室任助理教授。她做过研究生、培训医师、技术员和研究护士的指导教师等工作，丰富的实验室经历使她得以完成该书，这是至今惟一的一本描写实验室生活和工作的手册。本书并不是一本简单的实验室手册，对于重点理解以下问题具有极大帮助：研究人员如何开展工作并如何适应？什么设备是必需的且应该如何正确使用？如何建立一个实验？如何开始实验和组织实验？如何处理和使用数据及参考文献？如何介绍实验工作及实验结果？

本书分为三篇。第一篇确定方向，指导一个实验室新人，应该从哪些方面使自己尽快成为实验室的真正一员以及从工作、安全和功能上进行实验室的常规设施的布置，重点介绍实验室、功能实验台和各类仪器设备的作用。第二篇着重讲述从哪些角度考虑建立一个实验，并对实验中碰到的各种结果如何解释、如何对待以及如何记录实验过程和处理实验结果，同时详细介绍了如何向别人陈述你自己，尤其是如何陈述你的实验结果，包括口头报告和书面的投递论文及基金申请。第三篇是本书的重点——分子生物学实验室的常规实验部分：溶液的配制、灭菌、分装、储存、使用和废弃物品的处理；无菌操作技术；细菌和细胞的培养；传代和冻存；分子生物学三大支柱物质DNA、RNA和蛋白质的实验技能；放射性物质的特性、使用和防护；离心机的使用和梯度离心的制备；电泳及印迹转移；各种显微镜的使用及摄影。此篇重点并不是介绍专业化实验细节，而是介绍所有实验技术和实验操作的规则以及容易出错的细节和规避危险、危害的方法。

你可能在本书中找不到你需要的某一个具体实验的操作步骤，但本书可贵之处在于你一定能找到你所正在进行的实验的实验规则和哪些方面可能会犯错误以及如何做你才能避免错误或少犯甚至不犯错误。本书将为你节省大量的时间和避免不必要的物质浪费。拥有本书，就像拥有了宝贵的财富，拥有了可以随时找到的经验丰富的老师！

王维荣

2005年5月于上海复旦大学

原 著 序

作为一名研究生在实验室度过的第一周是我这一生中度过的最困惑的一周。除了专门的实验外，没有任何关于其他方面的书面指导。实验室的常规知识一般只通过口头交流而流传下来，但是什么时机问、问谁、以什么理由问，这些都需要花费大量的时间。问题总是没完没了，我不知道如何区分哪些是琐碎的，哪些是关键的。当然，像别人一样经过一段时间的努力，我找到了自己的途径，然后我就变成了新人来时所要面对的“前辈”中的一员，被他们坦率地询问：“你怎么知道应该转得多快？你怎么知道哪个污染起的作用？你怎么知道？你怎么知道？你怎么知道???”是的，我就是知道。某天你会注意到：在问题消失前你可能问了三四次，也可能将某些部分记录在了你的实验记录本上，或者记在了一张被你扔在抽屉里的餐巾纸上，以便下次重复时作为参考，但是大部分通过艰苦努力获得的专业知识被深深埋藏在你的脑海中，而这些知识通常是不能被随时利用的。

有些事情似乎是这样的，如果有人获得了能够解释新奇环境中的社会学和科学分支的某些知识，那么开始时的困难对于他来说可能是有益的。在星期五晚上的快乐时光中，大家谈论着实验室的生活，但同样的困难和问题依然出现着，通过长时间的口头传授还是没有办法获得这些知识。写这本手册的动力来自于帮助实验室人员从第一天开始就能够独立地熟悉环境，知道问何种问题和为何提出问题，并能像科学家一样发挥作用。

这本手册并不是提问的替代品，我从未放弃口头交流的传统，一对一的交流仍然是实验室的心声交流。向一个懂行的人咨询问题几乎总是比向书本学习来得好，但我希望，这本手册能使你了解一个实验室运行的全貌，不管你是请教人还是被人请教!

这本手册的最主要读者是实验室科研的初学者，他们已经具备一定的理论知识，但是没有实际操作的背景，这些人包括医师、研究护士、技术员和毕业生。新来的人可能是在大学课程中甚至在进修过程中获得的实验室经历，但他们没有负责过自己实验室的建设和向别人介绍自己的实验。

本书遵循了大多数人了解实验室的实际顺序，分为三篇。第一篇为确定方向，描述了如何处理实验室硬件和软件的配备问题。第二篇为策划实验教程，主要介绍在确定实验、结果记录及数据提呈等方面的合理分析与组织。第三篇为实验部分，是最集中的一个部分，包括通常情况下隐藏在实验操作指导后的一些细节，你可以通过此篇看到配制缓冲液时水的运用、冷冻细胞、清洗离心机转子等主题!

为了提供宽泛的基础知识，许多信息被省略了，但是仍有覆盖各种主题的优秀专业手册可供参考，其中的大部分在相关章节后面的参考文献中已经列出便于读者查找。

他和她，他的和她的相互交换，并且被随机选择。对于一个特别的工作，他与她的对抗联合并没有任何的暗示，当然当中存在一些幻想……在一个理想的世界里，某些规则可能起作用，但在真实的实验室中，可能经常会失败。每个人都必须参加学术讨论会

而不能打盹，都应该补上遗失的反应试剂，都应该每天记录实验操作。虽然生活太忙，但我们应尽力做好。

感谢阅读本书并对某些章节提出意见的人们，他们是：华盛顿大学的 Alan Aderem，阿尔伯塔大学的 Joho Aitchison，新泽西大学的 Jeanne Barker 和 Merck，Rahway，西亚图大学的 Linneabrodey 和 Pathogenesis 以及冷泉港实验室的 Kim Gavin，纽约大学的 Peggy Hampstead，杜克大学的 Sally Kornbluth 和 Danny Lew，哈佛医学院的 Bruce J. Maye，洛克菲勒大学的 Esmeralda Party。

我还要感谢洛克菲勒大学的 Hidesaboro Hanafusa 和马塞诸塞医学中心的 Peter Newburger，在他们的实验室中我学会了研究和实验操作。洛克菲勒大学的 Ralph Stainman，他为我开始这本手册的编写提供了帮助。许多同事耐心地提供建议和相关技术以及许多优秀实验图书的作者和参考文献中的网站等。Alan，Zoe，Petai 和 Sasha 翻阅了大量论文。最后，还有支持我的家人和朋友 Teruko Hanafusa，Ray Barker，Zan Cohn，感谢他们的鼓励。

与来自冷泉港实验室出版社的朋友一起工作是一件很惬意的事情，John Inglis 支持本书的出版，并负责整个项目的进行。Linda Rodgers 知识渊博，令科学资料变得生动有趣。Jim Duffy 的构图，既提供了图例又起到很好的鼓励作用，任何实验人员都将会认识到其构图的现实性。Mary Cozza，Pat Barker，Susan Schaefer 工作时相当幽默、有效且轻松。令我遗憾的是本书已经完成，不能继续与他们一起分享快乐的时光！

Kathy Barker

缩　写

这些缩写不仅是出现在本书中的词汇，还是一些你在实验室常常听到的词汇。

alkphos	碱性磷酸酶
amp	氨苄青霉素
AMV RT	鸟类粒细胞病毒反转录酶
ANOVA	方差分析
BAC	细菌人工染色体
BBS	公告板系统
β-gal	β-半乳糖苷酶
Bis	*N*，*N*′-亚甲双丙烯酰胺
BL 1，2，3 or 4	生物安全水平 1、2、3 或 4 级
bp	碱基对
BPB	溴酚蓝
BSA	牛血清清蛋白
CAT	氯霉素乙酰转移酶
CDC	疾(病)控(制)中心
cDNA	互补 DNA
cfu	菌落形成单位
CMC	临界微囊浓度
CMV	巨细胞病毒
cpm	每分钟计数
CS	小牛血清
CsCl	氯化铯
DEPC	焦碳酸二乙酯
DMSO	二甲（基）亚砜
dNTP	4种脱氧核糖核苷三磷酸(dATP、dGTP、dCTP、dTTP)中的任何一种
DOC	脱氧胆酸〔盐〕
DOS	退化寡核苷酸序列或电脑操作系统
DOT	运输系
dpm	每分钟衰变数
DTT	二硫苏糖醇
EHS	环境健康与安全部门
ELISA	酶联免疫吸附试验

EPA	环(境)保(护)处
EtBr	溴化乙锭
EtOH	乙醇
FACS	荧光激活细胞分离器
FAQ	常见问题
FCS	胎牛血清
FISH	荧光原位杂交
FPLC	加压液相色谱(层析)
FS	过滤灭菌
FTP	文档传送程序
g	世代时间
g	相对离心力
G_0, G_m, G_1, G_2	生长阶段
GLC	气相液相色谱(层析)
GMT	好的微生物学技术
HEPA	高效微粒空气(过滤器)
HEPES	*N*-2-羟乙基哌嗪-*N*′-2-乙烷-磺酸
HI	热灭活
HPLC	高效液相色谱
HRP	辣根过氧化物酶
IDLH	对生命和健康的直接危险
IEF	等电聚焦
IPTG	异丙基-β-D-硫代半乳糖苷
kan	卡那霉素
kb	千碱基
K_D	解离常数
LB	Luria-Bertani(路里亚-伯特尼),LB 培养基
LPS	脂多糖
M phase	有丝分裂期
MeOH	甲醇
MHC	主要组织相容性复合物
ml	毫升
MoMLV or MMLV	Moloney 鼠白血病病毒
MOPS	3-(*N*-吗啉代)丙磺酸
MSDS	材料安全性数据表
MW	分子质量
N.A.	数字(空)光圈
NaCl	氯化钠
NIH	(美国)全国卫生研究所

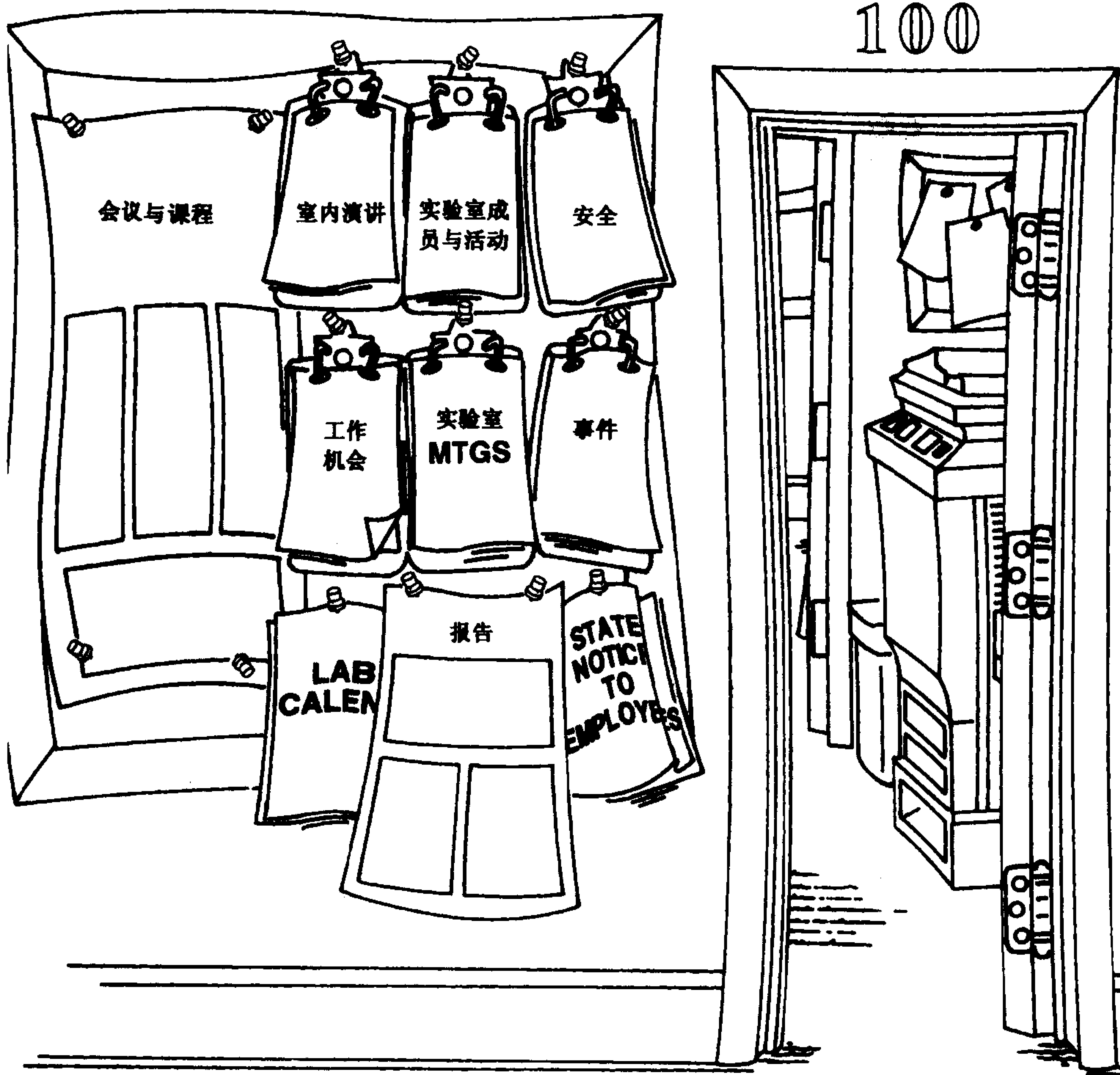
NFPA	(美)国家防火协会
NK	自然杀手
OD	光密度
OHSA	职业安全和健康管理
ORF	可读框
PAGE	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBL	外周血淋巴细胞
PBMC	外周血单核细胞
PBS	磷酸缓冲盐溶液
PCR	聚合酶链式反应
PEG	聚乙二醇
pfu	噬菌斑形成单位
P.I.	主管研究人
pI	等电点
PIPES	哌嗪-*N*, *N'*-双(2-乙烷-磺酸)
pK	平衡常数
PKC	蛋白激酶 C
PMA	佛波醇肉豆蔻酸
PMN	多形态核白细胞
psi	每平方英寸磅(磅/平方英寸)
PVC	聚氯乙烯
q.s.	定量、足(够)量、适量
RAM	随机存储器
RBC	红血细胞
RCF	相对离心力
RDA	代表性差异分析
RFLP	限制性片段长度多态性
RIA	放射免疫测定
rpm	每分钟转数
RSO	限制性位点寡核苷酸
RT	反转录酶
S phase	合成期
SDS	十二烷基硫酸钠
S.I.	标准单位
SSC	柠檬酸钠
TAE	Tris(三羟甲基氨基甲烷)-乙酸-EDTA(乙二胺四乙酸)缓冲液
Taq	噬热菌
TBS	Tris(三羟甲基氨基甲烷)-硼酸-EDTA(乙二胺四乙酸)缓

	冲液
TCA	三氯乙酸
TD	投放、给予
TE	Tris·EDTA 缓冲液
TEMED	*N*，*N*，*N*′，*N*′-四甲基乙基二胺
tet	四环素
TLC	薄层层析
Tm	熔解(解链)温度
Tris	三羟甲基氨基甲烷
URL	网络服务程序上用于表示信息位置的表示方法
UV	紫外线
WBC	白细胞
W/V	单位体积的重量
X-gal	5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷
YAC	酵母人工染色体

目　录

第三篇 实验部分

第一篇　确 定 方 向


100
会议与课程
室内演讲
实验室成员与活动
安全
工作机会
实验室MTGS
事件
报告
LAB CALEN
STATE NOTICE TO EMPLOYEES

第1章　普通实验室的组织进程

对生物实验室工作间的要求在不断地变化。在这里操作实验有一个令人惊讶的概念：你通过做实验来获得工资及荣誉，这几乎是一件不光彩的获得谋生的方式。工作是有意义的，你的衣着方式是随意的，工作时间常常根据实验的需要而由自己决定。实验室或部门中到处都是开朗而有趣的人们，你可以与他们讨论激酶实验所需要的盐浓度或最近国会开支的深刻含义。这里能给你带来家庭般的全部心理慰藉！

如同所有的复杂社会组织一样，实验室有自己的习惯与规则，问题是不常听到这些规则。你需要分析很多杂乱无章的线索，成为守法的成员，在这个体系中，个人主义被高度赞扬。虽然没有人期望你懂得如何安装设备，但你应该考虑如何安装！数据交流是职业过程中的目标，也是研究的回报，并不是所有人都能与你清晰而愉快地交流，但是不要着急，你会处理好的！一段时间后，与同事工作的乐趣会取代一开始时的混乱感觉。但是要做好你的工作，首先必须弄清楚时而出现的模糊混淆的信号，并学会如何使自己的实验室协调运作。

大　图　片

“实验室”可以由许多相互交叠的术语来定义，这取决于向哪些听众介绍实验室。实验室可以以它的基础研究领域名称来界定，如免疫学实验室、生理学实验室、生物物理学实验室等，这种定义更多的是一种管理上的界定而不是功能上的界定。实验模型(即常用来解决问题的有机体）也常常被用于扩展研究领域的描述，如：某个人可能是微生物生态学实验室、酵母遗传学实验室或人类神经解剖学实验室的成员。

研究领域是一种更有效的描述实验室的用语，因为它能告诉你实验室实际上所做的事情，可能某实验室是细胞周期实验室，或者称信号传导实验室。实验室可能是个聚焦点，一个问题将所有成员联系到一起，实验室所有人员可能致力于神经细胞分泌的研究，或试图了解与发育相关的特异转录蛋白质为什么作用和如何作用。实验室的每个成员都有自己的问题，他们试图通过实验的方式来解决这个特定的问题。

定义实验室的另一个方式是通过实验室从事的是基础科学还是应用科学来界定。基础科学是指纯科学，做科学的目的只是为了获取知识；应用科学则被认为是通过基础科学理论的运用来推动一种产品的发展，如抗生素。基础科学常被认为是学术研究之子，由软资金（研究性支持和/或竞争性授予的薪水支持）资助；应用科学则被认为是由公司运作，由硬资金（研究所和公司支付的薪水和研究支持）资助。这种区分不是很有效，大学和制药公司也从事基础研究和应用研究，学术机构和公司所做的研究也可能有硬资金和软资金的资助。对于在实验室工作的人来说，实践上的相同点比不同点更明显。

有些实验室从事临床研究，在那里病人或病人的细胞被用来检查疾病，工作多数由医生而不是博士来做。临床研究实验室通常仅出现在医学院或医院的附属机构，那里便

于接触病人。

实验室通常是大单位的一部分，如一个系或一个组，与全部门的成员共享仪器设备。大型设备如超速离心机和－70℃冰箱通常是部门共享的，只是它被放在了某一个实验室的房间内。冷库、温室、暗房、胶片冲洗室、灭菌锅和玻璃器皿洗涤器也可能共用，除非它们属于某个资金特别雄厚的实验室。多数系都有图书馆，藏有研究领域相关的期刊，这种图书馆常被用作午餐室或小型学术报告厅。另外，几乎每个实验室都有一个大的布告栏，靠近秘书室、图书馆或主办公室，用于公布学术报告会的时间、地点、工作安排、会议通知和系所新闻等。

充分利用院系的作用，你就不会在实验室中迷失，院系是一种资源，它能提供想法、设备和联络，与系所人员的交流能极大地影响你实验室工作的快乐和产出。

实验室人员

实验室群体有一种相当特别的活力，其中的人员相比其他群体的人员来说工作更加独立，组织结构更倾向于水平管理。实际上，这意味着每个人都是平等的，没有谁的工作是专门教你怎样做事。不能认为谁的职位比你低，就能够命令他为你配制缓冲液。你可能得到缓冲液，但却制造了许多负面的影响。与某人发生争执可能意味着没人愿意为你腾出冷藏空间，或者当你忘了将试管从水浴锅中拿出时没人会帮你拿出来，也没有人愿意帮你作计算，除非你改变你的态度!

实验室有为之工作的不同人员，由于不同义务和各种原因聚在一起，这些人员一般包括：

> 对待实验室里所有的人像尊敬主管研究人一样。

主管研究人，简称P.I.　这个人可能是实验室的领导、老板或顾问。他可能将更多的时间花在管理任务上，如写项目申请或研究报告，而不是做实验室的具体工作，但他却是实验室内大多数项目的智力支持。他或她，直接或间接地为实验室的研究资金负责，整个实验室的气氛——友谊和同志般的互助或是恶性竞争——都依赖于其人格魅力和领导能力。

博士后　这是对与博士后有关系的助手、助理及同事的简称（不同的单位有不同的称呼），是指获得博士学位（或者至少为硕士学位）为寻找P.I.职位在大学或企业中进行2～5年训练的人。尽管会在项目的特定方面与实验室的其他成员相互合作，但博士后一般在自己的项目工作上更加独立。

技术员或研究助手　技术员可能是为进入研究生院或医学院前获取更多实验经验的大学学生，或者是有适当报酬和权利的具有硕士学位的人。在理论上，技术员通常情况下是只留用两年的刚毕业的大学生。在公司或某些医疗中心，长期工作的技术员（可获得更多的报酬和荣誉）也是存在的。技术员的工作有多种，如订购材料、准备播放器、照看实验室的细胞系、协助研究室特定成员的实验等，同时也为他们自己的实验设计方案和进行操作。

> 一个专业技术员通常是实验室中最有技能和知识的人。

研究生　研究生通常是为了获得硕士或博士学位而在实验室工作的人。他们工作时间长，有充裕时间和饱

满的热情来进行他们的项目，与博士后一样，他们有自己的研究项目，在实验室4～7年的工作将使他们变得更加独立。

轮转学生 许多研究生院要求学生在决定进入实验室进行毕业论文之前轮流地在不同的实验室工作，这短短几周时间的研究称为轮转。轮转学生在实验室的时间从6周到6个月不等，常常参加的是短期的项目。他可能被要求轮转，也可能他想在新的领域学习技术，或是在从事更大项目前做些预实验。

暑期学生 暑期学生常是大学生，有时也可能是高中生。已经在实验室的学生可能有自己的小项目，而新来的学生可能会为整个实验室配制缓冲液，最常见的是被指定帮助某人完成实验工作。

住院医生 住院医生常出现在医疗中心的实验室，他们研究人类疾病的某一方面，通常在自己的领域用几周到几个月的时间做一些短期项目。住院医生常是某些研究人员的同事。

访问人员 在休假期间，一个研究人员可以到另一个实验室，在那里他能学习一种新的技术，尝试一个新的领域，或是在一系列实验中与人合作。

秘书或助管 他们可能负责订购实验室所需要的材料，也可能帮助实验室成员申请项目，组织实验室学术报告会和期刊俱乐部，或仅仅为主管研究人服务。特别值得注意的是秘书是实验室最重要和最必须的人员之一，但实验室的某些成员可能会低估其作用并粗鲁地对待他们。

实验室助手 院系或实验室中的一些工作由实验室助手来完成，他们被雇佣来完成一系列特殊的任务。这些人通常不被当作科学家来训练，但能够通过做一些沉闷而耗时的工作来极大地帮助实验室。例如，有专门配置培养基和洗玻璃器皿的助手，配置培养基的助手配制和分装细胞培养基并灭菌和倒平板，玻璃仪器清理助手主要清洗脏的玻璃器皿和吸管，可能还分发洗净的和灭菌的物品。这些对于小实验室来说是奢侈品，可能无力承担这项负担。因此这项工作可能是一个系的共同工作，一个人可以负责几个实验室的工作。

> 知道某人在实验室中的位置可以帮助你了解他能做到的但对你来说是费解的特定的事情，这还能建议你哪个人可能是请教特定科学或个人问题最好的人选。不要仅凭一个人的头衔来定义他，那样你可能错失大量信息，如果你不那样看人的话你可能会铭刻在心。

实验室监督 实验室日复一日的操作由实验室监督来监管，他可以从保藏实验室的库存、组织期刊俱乐部到建议实验方法等等。无论在什么情况下，不能因为监督的存在而阻断你和主管研究人之间应有的讨论。

实验室安全员 在一个实验室做了好几年的某一成员，被指派作为实验室与环境健康与安全部门（EHS）部门的联络员。如果你对健康、安全或实验方案的合理性有疑问，在向环境健康与安全部门部门的人员反映之前，应该先和实验室安全人员说。这一职位通常是系里设置的一个职务。

实验室日常事务

虽然实验室的工作使得人们整天忙进忙出，有时会很乱，但日常规则和习惯始终在

起作用。在实验室清晰运转的情况下在该环境中找到自己的位置一般要花费几周的时间，尽可能的不与自己妥协，开始尝试着在特定实验室的日常环境下工作。

工作时间

由于实验研究往往与“朝九晚五”的步伐不相匹配，实验室工作者常常碰到超长的、不可预期的和非常怪僻的工作时间。大多数人允许调整自己的工作时间，最大限度地与学术部门相配合。即使实验室是一个学术实验室，关于工作时间没有任何的规定，但是还是可能有一个期望的时间标准。公司和医疗部门常有更多的传统工作日，因而学术部门看起来可能更随便，有更多的深夜实验，但两者都存在的问题是工作比想象得少，有时候说不出口的预期工作时间会难倒新来的人员。找出什么时间工作并尝试着遵守它，是大家期望的。如果大多数人倾向于早上晚到，晚上工作时间晚，请尝试着跟他们一样做。与其他人工作时间不一致会使你了解别人以及获得你所需要的帮助变得困难。

职位影响工作时间，通常因为人们相互依赖，技术员和秘书要求在更规则和预期的时间内工作，但是如果你希望留下来完成实验或项目，惟一的事情就是你应该更自由地选择工作时间。

你个人的情况可能不允许你在实验室工作时间内工作，孩子、上课、路途往返及同伴等都是影响你工作时间的因素，尽可能试着将你的工作时间与其他实验人员相一致。预先了解一下你的工作时间，因为你肯定不想处在以下这种情况之中：你偷偷走掉却做了一些不自然的事情，如开着灯和仪器显示你还在工作，借此体现自己的工作积极性。

假期政策也因不同的实验室而不同，而且常常是不用说的。在许多地方，人们一般不愿休假，因为放下手中的项目去休假似乎是错误的，即使项目进展顺利，你也会有一堆不愿出门的理由，如果项目进行得不顺利，在项目走上正轨前你会充满负罪感而不能离开。好好利用你的时间，但也不要滥用独立决定的权利。

穿着方式

在实验室工作的一个令人羡慕之处是可以自由地穿你想穿的衣服，医院和公司的员工常常比学术机构的人员穿得正式，因为他们必须与非实验人员和病人联系。学术机构的某些人员如果想到他们穿衣服还要受到限制，甚至某些习惯也要调整，那他们可能更易被激怒。这是一个个人问题，最好是你穿任何你想穿的服装，没有任何人会对你的穿着产生疑问。

有一些实验室穿着的常识：

- 如果不想让酚或漂白剂洒到你的衣服上，最好别穿好衣服，这些东西好像就喜欢往你最喜欢的或贵重的衣服上洒；
- 如果你必须系领带，请远离本生灯的火焰范围。

实验室任务、实验室工作和分派的工作

在许多实验室，实验室人员必须从事一些共同的工作，典型的工作包括配置几升常用的缓冲液、取干冰、调节培养箱中的 CO_2 控制阀或整理放射性同位素废物。这些工作可能是长期性的，也可能是在规定的时间内大家轮流。有时候工作对象是一些特别的仪器，这些仪器通常有指派的人负责维持其正常运转。

播放收音机 多数实验室的主实验间都有收音机或 CD 播放器，对音乐选择的争执很快会升级为一场战争，不要参与到这种争论之中去。如果你不喜欢这些音乐，你可以买个耳机或随身听。

认真对待给你分派的工作，不要总是把它安排在你自己的实验后面，其他实验人员也许要依靠你忘记配制的缓冲液完成实验。即使你不会使别人的实验彻底毁坏，你也会得到一个坏名声，试着愉快地完成此类工作。

实验室会议

实验室召开的会议要讨论实验者目前的研究工作、该领域目前的研究现状（因为经常讨论一些近期的期刊文章，也被称之为期刊俱乐部）和管理问题。这些问题可能会合并成一个或两个会议，小实验室可能没有自己的会议，但应参加系里组织的会议，许多实验室或系都有一个每周例行的期刊俱乐部和研究例会。

参加所有的会议 除非你有一个急得非做不可的实验，否则安排好你的时间以保证参加所有的期刊俱乐部和研究会议，你可能会学到很多东西。你的加入显示了你对同行的支持，对部门凝聚力也很重要。

在研究会议中，一个或两个人陈述他们的研究数据。有些实验室，所有的实验人员都进行简短的发言。这些交流可能很随意，如午饭后用一块小黑板或放映机，最为正式的会议可能要求幻灯片和着装。

期刊俱乐部几乎都是比较随意的，尽管有些已习惯用投影仪或者黑板来介绍论文。一般在会议开始的前几天会将介绍的论文列出来，以便让每位参加者能读到该论文或至少对该论文的主题有一个初步的了解。

参加实验室会议的都有哪些人呢？大多数是实验室的中坚力量：学生和博士后，还有技术员、全体员工和由实验室安排的短期人员。当然，如果你想参加但未被要求，你应该问一下实验室领导是否能够参加。

如果你期望参加，你将会被特别地给予一段时间参加研究讨论会。一般情况下，如果你以前做过研究，那么作为应该选择过去的研究课题第一个研讨会。实验室会议的差别很大，第 6 章的部分章节将对实验室会议的参与及其准备做详细介绍。

你可能期望参加，但你会有一段时间来准备，尤其是研究讨论会。期刊俱乐部和研究会议的形式差异很大，对于你的首次报告会，至少应按照实验室的格式准备。第 6 章将对此类报告作详细介绍。

第一周计划做什么

☆ **你将被指派到一个实验台去，或是实验台的一部分。**你可能会被安排在一张实验台或是实验室的公共办公区域。如果地方非常小，不要不愉快。大多数实验室中，空间是真正的荣誉，一般越是成功的P.I.，其实验室越拥挤，每个人的空间就越少。你常会看到许多人有很大的空间，但是不要抱怨。

☆ **实验室领导或是负责你实验的人，可能会坐下来与你讨论将要进行的项目。**在你进实验室之前，该项目的基本背景可能已经向你描述过，但现在是你发现其中特别之处的时候。如果你有与其他人密切工作的机会（而不是完全单独工作），你要抓住这种机会。你将会获得比你自己总结的指导建议更多的帮助，以后你也能够自主与人磋商。

如果可能的话，在谈话之前，阅读一些与你正在研究的课题相关的文献，或者了解实验室工作的主题。如果有些事情不太完美甚至是毫无意义的，也不要着急，只要你做了一些实验之后，所有事情就会变得更为清楚。

☆ **你会得到实验室的钥匙和门卡，还有该机构的身份证明。**钥匙可能不仅是自己实验室的，还可能涉及系里其他实验室公用的地区，不要滥用这些钥匙在其他实验室的成员下班后去四处溜达。

☆ **你会在冷库、-20℃及-70℃的冰箱中分配到一些储存空间。**实际上，人们认识到哪个空间是属于自己的需要花费一些时间。这对于每个想要扩展可用空间的人更是如此，找到在哪里能存放一些你的东西，并等待永久的储存空间。

☆ **你可能会通过人类资源学系接受规则。**通过录像、阅读、讲座等方式，你会接受到有关性和口头侵犯的防范训练，还有关于吸毒和饮酒方面的警告。认真接受这些训练！会有一些单位内部的规定不合法，所以你必须知道你的权力和应当遵守的规范。

☆ **你可能会与EHS（环境健康与安全部门，也就是负责实验室安全和/或辐射安全的部门）签约，其功能是关于个人安全、辐射使用和生物危害物处置的监督。**关于一般实验室的安全警告及你所在单位的特殊规定会通过电影或讲座的方式进行。如果有必要的话，你可能要接受放射性使用的指导及提供有关辐射监测仪来监测你被辐射暴露的情况。特别是，如果你的工作要接触到人血或细胞，必须注射乙肝疫苗。接触其他特殊有机体的还需要注射其他的疫苗或进行测试。如果你在实验室或系里接触到放射性碘，你还需要做一个基础碘的测试。

进行来自人类的实验材料（如组织、细胞系、DNA或蛋白质）的实验将接受特殊的规则。每个单位都有一个单位检查委员会（IRB），他们的目标是保护人类，你必须遵守他们的伦理和实践指导。如果你正在申请或使用NIH（美国全国卫生研究所）的经费进行人类主题的研究，你还需要接受附加的训练，现在这种训练可以通过网络在线课程(http://cme.nci.nih.gov)进行，应确认你是否需要与IRB接触。

如果工作要接触到脊椎动物，你要接受动物训练，这常常在动物实验室进行，你可能必须亲自与动物实验室联系接受训练，哪怕是接触动物的一条腿也得接受训练。

第一周做什么

☆ **做个实验！**不要等到你理解了这个系统后才开始做实验。只有你做完第一个实验，你才会准备好有效地学习。这很奇怪，但的确是实验室的头号真理，它会帮助你感觉到你是实验室里有效的成员，这个实验可能并不像你想像中的重要——实际上，它很简单而且可以用来检验你的结果，你可以用这个结果反证实验室其他人实验中常出现的结果。

☆ **建立你自己的实验台。**有序、易找、清洁、整齐，就是对你的实验台和实验空间的要求，尽可能根据做实验去思考问题。

☆ **把自己介绍给每一个人。**实验室成员进进出出，每个人都很忙，如果你没有受到红地毯式的接待，请不要觉得渺小。让每个人知道你是谁、你是干什么的。请教所有人有关他们的课题通常是打破僵局的办法，每周最好与实验室成员共进一次午餐。

☆ **对所有事情做笔记。**这不仅仅是个礼节，也是必须要做的事情。第一周你会接受到很多信息，你不可能记住所有的细节，当你发现自己独自在夜间工作却不知道所需的反应剂放在哪儿，记录的细节会变得非常重要。

☆ **让自己熟悉实验室如何运行、物品放在何处以及是什么人在什么时间准备的。**在不太打搅别人的情况下观察和询问一些问题，不要在别人做实验的时候询问有关午餐室或电话之类的事情。

☆ **询问。**事实上，你不想打搅任何人，特别是在没有必要的情况下，但询问一个关于实验程序、试剂、设备等方面的问题，总比浪费时间和金钱要好得多。如果你做错了，请教你的伙伴可能使问题得到纠正。同样的错误被新来者一次次地重复着，询问是一种能够解决许多明显拙劣实验的方法。

第一周要发现的事情

化学试剂：化学试剂放在哪里？如何放置？在哪儿称量和测定 pH？

计算机使用：你有机会接触电脑吗？如果有，什么时间？密码是什么？你能在上面进行文献查找吗？有进入万维网的路径吗？你能收发邮件吗？如何获得电子邮件地址？

急救：出现紧急情况打什么号码？药和急救箱放在哪里？消防器在哪里？如何使用？

玻璃器皿：干净的玻璃器皿放在哪里？脏的玻璃器皿放在哪里？是有人清洗所有的玻璃器皿，还是每个人负责洗自己的那部分？

单位图书馆：图书馆在哪里？使用图书馆需要什么？在图书馆怎样制作影印件？你能通过实验室电脑进入图书馆吗？

实验服：实验室提供实验服吗？如果是布的，实验室负责洗吗？

实验室会议和期刊俱乐部：实验室会议和期刊俱乐部的时间安排表是什么？张贴出来了吗？会议的模式是什么？

实验室笔记本：记录实验结果要遵循实验室的规则吗？是活页薄好还是装订的笔记本好？提供记录本或活页簿吗？必须对每天的数据做备份吗？

订购：是每个人自己打电话订购？还是实验室有专职人员为所有人订购？要遵守严格的预算吗？能通过电脑订购吗？订购物品送来时谁负责接收？

复印机：是否需要卡片或号码？或者记录影印的顺序数字。

垃圾处理：谁负责倒垃圾？有生物危害的材料送到什么地方？谁负责收集？废弃的针头和尖锐物件丢到哪里？可回收的纸张如何处理？

工作时间：实验室成员倾向于什么时间工作？你的合作者什么时间在实验室？什么时间是第一个使用设备的最好时间？

第一周不应做的事

☆ **参观时，不要总是提“我的班级/我的另一个实验室/我的医院”**。这种隐含的侮辱是不受欢迎的，在实验室呆上一段时间后，当你有机会真正评价实验室一些特殊事情的做法时，你才能提出一种更好的解决方法或发表你个人的想法，但是现在，听着。

☆ **不要在实验室读报纸、小说或玩电脑游戏**。实验室的每一天，尤其是在早些时候，都有许多空档时间（即不做实验的时间），在其他人努力工作的时候阅读体育版会给别人留下很坏的第一印象。这可能不是大麻烦，但实际上已经发生了，应该利用这些时间阅读相关的文献。

☆ **不要询问和抱怨金钱和薪水的事情**。这些事情是科学天地中的剩余产物，作为一个严肃的科学家，除了工作应该忘掉其他的问题。对金钱的兴趣暗示着这个人不满足于科学发现的美丽。现在的科学家不得不变得更加实际一些，但仍然存在一种共识，就是讨论金钱的事是非职业的。在你到达实验室之前可以谈论你的薪水和利益，对于不公平的议论仅仅树起你的耳朵，千万不要以你的朋友在其他实验室的薪水为理由把你手头的工作搁置起来。

☆ **不要过多的用电话和复印机处理自己的事情**。在实验室尽量远离非专业性的事务，如果你必须因私人原因使用电话，那么尽可能短地结束通话，尤其是在你和其他实验室成员共享一个电话时。

在第一周，新的实验室人员会习惯性地复印数十打的和他们的新研究领域相关的文章，其中很少一部分会被阅读，能记住的就更少了。复印一篇论文并不能通过渗透作用增强你吸收信息的动力。事实上，你更可能通过立即阅读这些论文并立即记下重点而学到更多的东西。

☆ **不要表现你在实验室工作的原因超出对研究的热爱**。如果你有另外的原因，仅仅藏在你的脑袋中，否则你会被认为对你的工作不认真。说一些譬如“我在这儿仅仅是为了获得更好的职位”的话，你就贬低了大多数人在这里工作的原意。

生存常识和礼节

遵守实验室简单的礼节。对于与你的合作者保持一种良好的关系和对做好自己的工作一样至关重要，这一节也可被称作是“实验室生存”或者“**如果你想要在本书中读到**

什么信息，那么请读这一节”。

实验室中的每个人都愿意帮助别人，但是都太忙。尊敬能帮助你学会如何搜寻到你所需要的知识。这些原则听起来很刺耳，但是它们是这个环境中的常识，在这个环境中，群体的目标在功能上次于个人的成就和责任。

甚至在民间传说和小说中，不顾及别人的实验室研究者会引起一个问题：

弗吉尔的免职没有使他的同事过度的悲伤，他在 Genetron 的三年时间里，无数次违犯了实验室的礼节。他几乎没洗过实验室中的玻璃器皿，两次被指责没有擦掉洒在实验台上的溴化乙锭（EB，一种强致变剂），对于放射性核素他也没有很好的注意！（在 Bear 的允许下引用）

在 Art Riggs 的实验室中，对于礼节的忽视被认为是比侵犯某些工作人员好不到那里去的行为。Riggs 习惯一丝不苟、仔细和严谨，比如，在他的技术员 Louise Shively 怀孕后，他承担了所有涉及放射性同位素的工作。旧金山的科学家就不同，Shively 回忆到："简直不可思议，从第一天开始，无论他们在哪儿工作，他们总是把身后堆起的垃圾清理得干干净净，他们简直象旋风一样"。Riggs 很少会回忆起他们在实验室显示礼貌的事情，但正如 Goeddel 承认的："我们非常关心实验室的项目以致我们听不到太多的东西"。为了每个人的信仰，他们在通过大厅的一个小实验室中做了他们大部分的工作。(Hall 1987)

礼节可能不总是麻烦事——弗吉尔因为感情脆弱死于长篇小说的创作中，但事实上 Goeddel 却在胰岛素基因克隆中发挥了作用——但礼节肯定在帮助实验室更有效、平静和令人愉悦地运转中起了作用。

基本生存规则——态度

1. **请问，不是命令。**实验室的其他成员是合作伙伴。
2. **不要假定任何事情。**你不应该假定别人会立刻停下他的实验，在你需要的任何时候来帮助你，也不要假定其他人会去处理培养箱的警报声，至少在开始的时候。让你的期望更为谦逊，同时也不要假定别人总是正确的。
3. **请全部记下别人给你的指导。**不同的人会给你不同的信息，你应该避免一次次地询问同一问题。记下人名、培养时间和温度、试剂的放置地点、灭菌锅的使用指导、所有这些可能会帮助解决另外一个问题。这不仅对你的记忆提供心理优势，更能够通过这样让他们知道你对他们所说的事情感兴趣而获得好的名声。
4. **与别人预约或请求时间。**实验进行期间，时间很紧，别人甚至连 5 分钟时间都有可能腾不出来（在实验室，几乎没有什么事情只花费 5 分钟能够了事）。在他们有时间时询问他们，不要等到你的样品正在融化，而只有 2 分钟的空余时间时你才真正地请求他们帮忙。

> 不要在别人写东西或操作试管时问他问题，让他知道你的存在并且等待，直到他感觉能够有时间回答时再询问。

5. **不要移动系图书馆的杂志。**除复印文章外，将杂志放回到原属于它们位置的书架上。

如果允许在图书馆进餐，在你离开之前，清除所有的碎屑和残留物。

6. **不要和实验室以外的人讨论实验室人员的研究结果。**这可能是担心相互竞争的实验室，或者还不成熟的数据需要进一步验证。

> 如果纽约某个实验室在早上发现了一个热门的结果，加利弗尼亚的每个实验人员到下午都会知道。任何两个实验室的成员间常远远少于6个分离等级，因此敏感的实验结果必须完全保密，直到研究者准备谈论它。

基本生存规则——实验台科研的礼节

1. **没有许可不要使用别人的试剂或缓冲液。**别人实验台上的缓冲液和试剂是非常珍贵的，也是私人化的物品，这些东西可能要灭菌，可能不含RNase，没有主人的同意，你连1ml也不能用。

   有些东西可能不是所想像的那种东西、或者不是标签上所标记的东西，使用后还有可能会完全破坏你的实验。实验室的某些地方可能有公用试剂，在接触它们之前，你最好知道它们是什么东西，在什么条件下使用。

2. **如果公用试剂剩下很少或快用完时，多订购一些备用。**不要把空瓶子扔回去，设法订购这个试剂，可以在货架上留张带日期的便签说明该试剂已经订购。

3. **不要忽视设备的破损部分或提出警告。**在进实验室的早期，你可能不会处理出现问题的设备，但你应该提醒其他实验室成员以采取适当的措施，不要仅仅是使用另一台离心机或胶槽，而把问题留给下一个准备实验的人。

   如果听到仪器发出蜂鸣或警报声，应立即采取行动。忽视它的结果可能造成一场灾难。特别是，一个低温冰箱断电或温度控制失灵，液氮储存罐无液氮会使全部克隆、细胞系、纯化的蛋白质和cDNA文库丧失。如果是你的错误所引起，你将不得不离开!

4. **不要移动周围的东西或是改变试管、试剂和仪器在公共实验室区域内的位置。**虽然不是什么有意义的事，但人们通常通过标签和地点来找他们所用的试剂，因此尽可能地把它们放到离原始位置近一点的地方。如果你必须移动什么东西，提醒物品的主人知道。

5. **不要到处乱放东西，除非是属于你的地方。**这意味着不要把摇瓶放在洗涤槽中，不要把吸头放在废物中，除非是正确和指定的目的地。

6. **如果你做错了事，坦白承认。**通过很多方式，每个人可能都会知道你所做的事情，因此最好说出真相，这能让实验室的人觉得你很诚实，这在研究工作中不是一件小事。每个人都会犯错，但偷偷地掩盖错误会让人很难受，如果可能，尽量弥补错误。

7. **每部分实验做完后（最好是在实验期间）立即收拾干净。**清理是实验的一部分，不用做额外的事情来显示你是个完美的人。特别要注意保持实验室公共区域的清洁，如洗涤槽、细胞培养箱和电泳区域。清理你的随身用具和残物，这会帮助其他人加快实验进程。

8. **要求最小的关心。**如果你真的要走开，请别人在影响他工作最少的时候帮你终止或

完成实验是可以的，实验室人员通常依赖这种相互间的帮助。但是不要因为你想看场电影而让别人做很多事情。

必须遵守的安全规则

1. 遵守一般的实验室安全规则

- 不要在实验室吃东西、喝酒或抽烟。人们常常在办公桌前吃东西，但这不是一个好习惯。这样做不仅不雅观也有损健康，而且如果被实验室安全人员抓住，他们会很恼火。实验室附近会有吃和喝的地方。

> 如果发现实验室有人吃东西，实验室可能会被关闭。如果是第一次，通常会被警告。

辐射标志 生物危害标志

对有潜在危害的标志要了解，实验室常见的两种标志是黄色的辐射标志，指示那里有放射性物质储存或被使用，还有橙色的生物危害标志，被张贴在有传染源的地方。不要在任何其他东西上使用这些标志，包括冰箱和培养箱，除非你得到实验室安全人员的同意。

- 不要穿露趾鞋或短裤。因为有些东西可能会洒到你的脚上造成损伤。
- 在实验室应穿实验服。许多实验室不考虑实验服的款式，造成不能靠在实验台上和不能用漂白剂洗，或容易在你的衬衫上留下一个小洞。
- 不要在实验区域以外的地方洗实验服。因为实验服保护了你，使你远离腐蚀，但也可能带有感染性物质，让别人接触到这些有害的东西是不明智的。如果社交需要在报告会或午餐穿实验服，那么穿上一件干净的实验服。
- 不要用嘴吸吸管。即使是灭菌水也不要！请用吸耳球或机械移液器。

2. 了解紧急情况下如何帮助自己和实验室其他成员

- 记住紧急安全电话号码。可能只有一个为危急情况准备的紧急号码，也可能是单位EHS和大学警备安全部的号码，不要忘了还有当地警署和紧急安全部门的号码。
- 找出急救箱、辐射和化学溅出物处理箱、眼药水及安全淋洗区的所在地。让实验室的成员熟悉安全规则。

3. 不做任何你感觉不安全的事 如果你对程序有任何问题或不解的地方，与实验室安全员及EHS一起检查。

（赵迎春　王维荣　黄伟达）

参 考 文 献

Angier N. 1988. *Natural obsessions. The search for the oncogene.* Houghton Mifflin, Boston, Massachusetts.

Bear G. 1986. *Blood music.* Ace Books, New York.

Crotty S. 2001. *Ahead of the curve: David Baltimore's life in science.* University of California Press, Berkeley.

Goldberg J. 1988. *Anatomy of a scientific discovery.* Bantam Books, New York.

Gornick V. 1990. *Women in science.* Simon and Schuster, New York.

Hall S.S. 1987. *Invisible frontiers. The race to synthesize a human gene.* Tempus Books, Redmond, Washington.

Kornberg A. 1995. *The golden helix. Inside biotech ventures.* University Science Books, Sausalito, California.

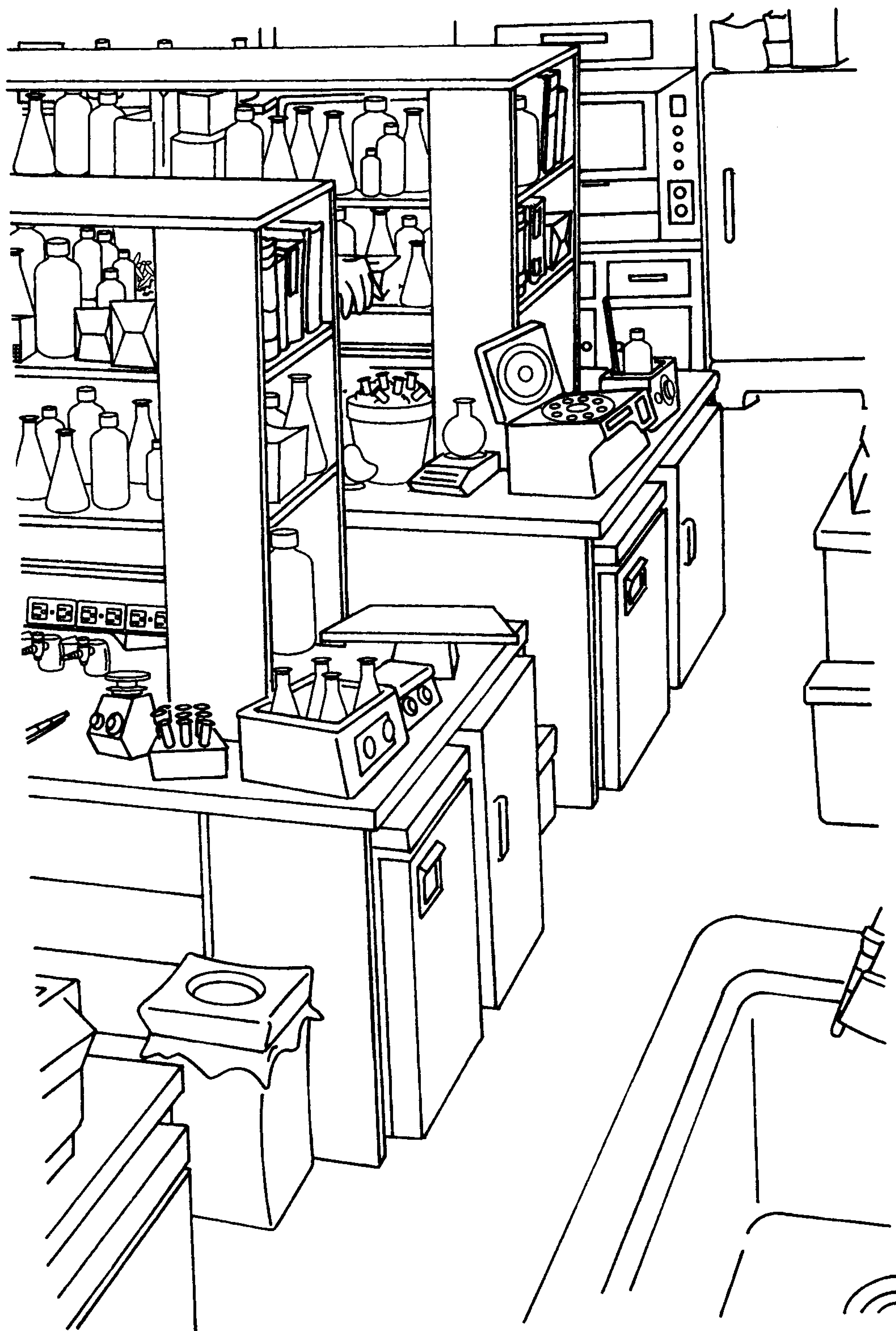
Lewis S. 1961. *Arrowsmith.* The New American Library of World Literature, New York.

Maddox B. 2002. *Rosalind Franklin: The dark lady of DNA.* HarperCollinsPublishers, New York.

Teitelman R. 1989. *Gene dreams. Wall Street, academia, and the rise of biotechnology.* Basic Books, New York.

Watson J.D. 1968. *The double helix.* The New American Library, New York.

Weiner, J. 1999. *Time, love, memory: A great biologist and his quest for the origins of behavior.* Alfred Knopf, New York.



第2章　实验室的建立与设备

开始，看到实验台上、地板上、甚至过道里的大量仪器你会觉得很迷惑。在大多数实验室里，这是非常标准的仪器，过一段时间，所有的实验室看起来非常相似。在某些专门的实验室里，如电子显微镜实验室或电生理学实验室，可能会有一定的非典型的设备，但一般实验室环境还是很清晰的。

如果你不了解用于实验的设备，你就不完全了解实验，马上开始学习仪器的各个部分，并了解其用途。这不仅会让你感觉更像在家里一样，而且也会帮你了解实验的潜力。注意一下谁在用它，当你需要时，你就知道在哪里能找到专家。当有时间使用特别的仪器时，确信了解该仪器的操作，只有在正确的操作条件下，你才知道一些意料不到的清晰的高质量的结果只是因为机器故障引起的结果。

选　　址

主实验室

实验台在身体和心理上都是占统治地位的：这是些或长或短的长方形区域，下面有抽屉，上面有放试剂瓶的架子，台面上是小型仪器和敞开式的工作空间。实验台的一端常连有一个办公桌，每个人通常拥有一张实验台，或仅拥有实验台的一部分，这一部分就是他的“家”。与你共享同一实验台的人是你的“台伴”，他可能会看到你所有的实验操作过程甚至你情绪的好坏。

有些实验室全是“私人”实验台，实验人员在他们自己的实验台上完成所有的任务。检查一下，因为私人实验空间与公共区域的规则有所不同，在你的实验台上，你可以留下用过的纸巾或移液管，但你必须一丝不苟地清除公共区域上你的材料和废物。

典型的实验室实验台

一块木板、石板、金属板或塑料板，这将是你实验室生活的中心，主要工作的区域。实验台上有小的仪器，如涡旋混匀器、各种移液器架子和诸如移液头等物品。

多数实验室的实验台配有真空管、空气管、燃气管，有时还有水管。理论上水管最有用处，但实际上用得很少，因为水管会使实验台沾水；空气管可以用来吹掉试管中的阻碍物、快速干燥玻璃器皿和一些粗野的用途，但管内吹出的是脏的空气，不能用于将要实验或配置缓冲液的玻璃器皿；燃气管用于燃烧实验台上用于无菌操作的本生灯；真空管对于除去漂浮物特别有用。

实验台上通常安置有架子，上面存放有个人的缓冲液和试剂。装满了去污剂和Tris缓冲液瓶子，移液头和离心管也排在那里。

如果实验台下有带抽屉的柜子，那里会储藏有酸、碱（当然不在同一个柜子里）和大瓶的缓冲液或试剂。不成对的、旧的、常用的或不常用的小器具也会存放在那里。

实验台下会有一些抽屉，可以看到各式老的 pH 试纸、巴斯德玻璃移液管和尖尖的物品，这些抽屉提供给匆忙的研究人员放置零星的和用过的物品，以待事后整理。这里还能见到盒装的移液头、一包一包的管子和各种不定的实验器具如制胶装置和梳子。这些抽屉往往被视为是个人空间，因此在没有询问前千万不要乱翻别人的抽屉。

实验台上也可能放有公用实验室器具，通常放在顶端。实验台上有公用器具并不表示你有优先使用权。使用别人实验台上的公用器具并不意味着允许你使用他实验台上的吸头、管子或其他物品。



图2-1　实验室实验台

①间隔，实验台间的区域，更多的是心理上的空间而不是身体上的。与某人共享一个间隔会形成一种相互靠近的密切的联系，间隔中的仪器一般是共享的，便于实验试剂的借还、请求些小帮助和讲讲故事等。友好对待你间隔的同伴。②办公桌，老式实验室的办公桌通常不是实验台的一部分，但在有空间的情况下却到处可见。有些实验室很少会看到办公桌，有专门的房间放着办公桌供系里的学生和博士后使用。有时不是每人都有一个办公桌，一般会用系里的资料室或会议室来进行阅读或作笔记的场所。通常在实验台一端靠墙的地方会设置办公桌。③盒装吸头，移液器需要合适大小的移液头来准确转移液体，这些吸头在用之前常要经过灭菌，可以任意使用。④移液器，用来测量和转移小体积液体的工具。⑤涡旋混匀器，用于混合管中物质，可用一个转换器使用多根管子。**替代品：**Nutator、机轮、震荡器。⑥加热台，用于加热液体，样品常用加热台上的大烧杯加热煮沸。**危险：**烧开的液体会喷出。**替代品：**水浴或微波炉。⑦火焰灯（也叫本生灯），用于无菌操作，主要用于加热瓶口和接种环等，有户内配备的煤气连接，每次用完后关好。**替代品：**电环灭菌器和一次性塑料环。⑧凝胶盒，用于电泳蛋白质、DNA 和 RNA，凝胶盒的大小不一，从微型凝胶到测序凝胶。⑨电源供给，用于电泳和凝胶到滤膜的转移。不小心操作会导致触电。不是所有的电源都适合工作，你应该为自己的工作选择好适当的电源。⑩微型离心机，小型的台式离心机可对2 ml 的离心管产生12 000g的离心力，主要用于收集细胞和沉淀 DNA 等。有些型号有制冷功能，大多数没有，有些离心机会被放在冰箱或冷库中工作。**替代品：**可选用较大的离心机和马达。⑪缓冲液和其他试剂，大多数缓冲液在灭菌后可以室温贮存，它们属于实验台的主人，没有允许不要乱碰。

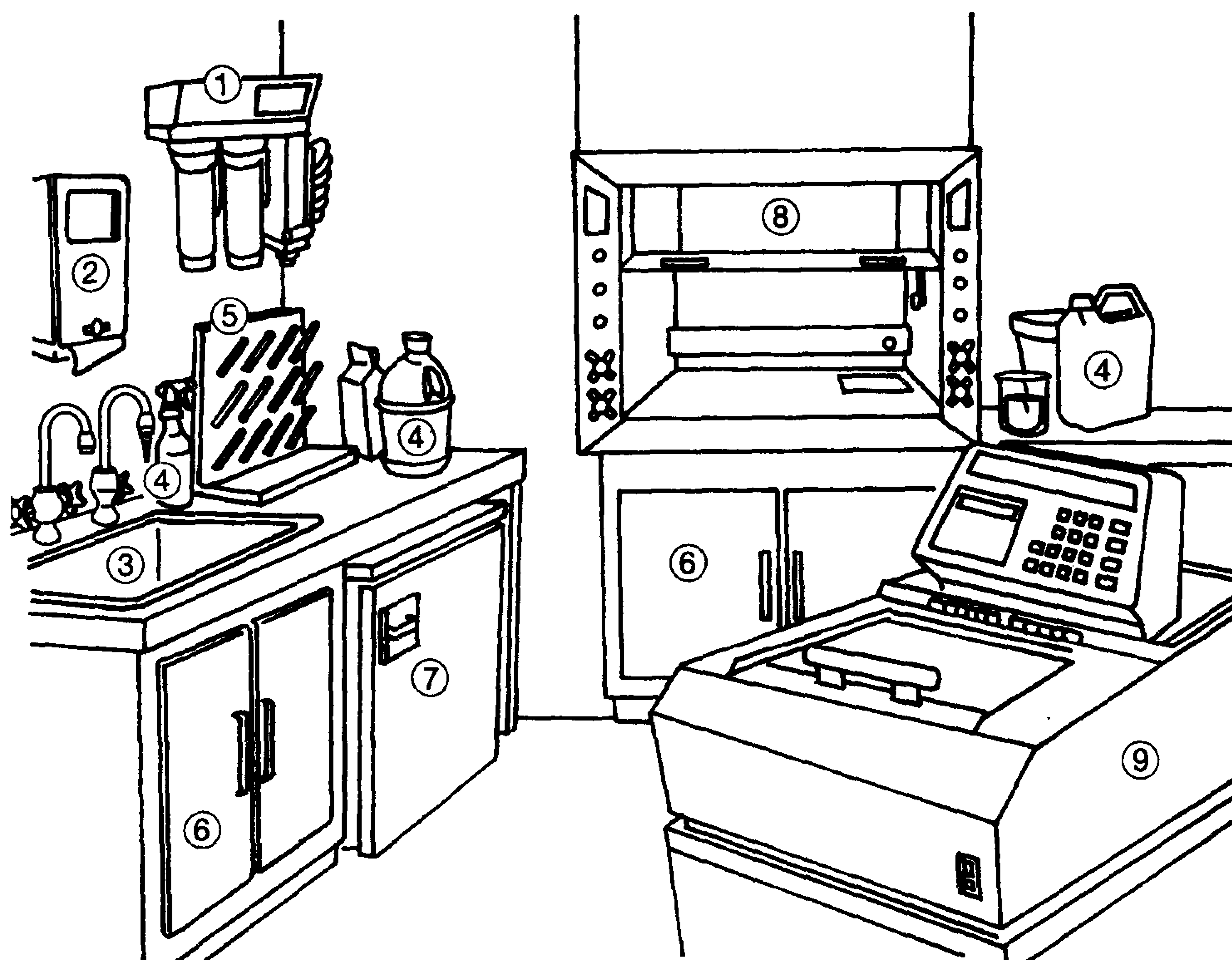


图 2-2 洗涤区、离心机和化学物质安全橱

①水纯化系统，大多数实验室用水不能用自来水，通过蒸馏、反相渗透或离子交换等方法除去自来水中的颗粒和其他杂质。**替代品：**可购买 500ml 或 1000ml 装的纯净水。②纸巾，用于擦干手或实验台，有时也用来记录数据。如果你用完最后一张要补充库存。③洗涤槽，保持洗涤槽的清洁以便处理器具和工作，小心你倒到洗涤槽中的东西，未经处理的细胞和细菌上清液不能倒在这里，危险的化学品也是一样。④去污剂，可能有几种去污剂和清洗剂，包括洗手的、洗涤玻璃器皿和洗涤放射性物质的。⑤干燥架，洗涤后，烧杯或其他的实验用具放置在干燥架上晾干。⑥橱柜，酸、碱或有机溶剂储存在实验室的公共区域。⑦ -20℃冰箱，用于储存血清、大多数的酶和试剂，一般实验室里会有多个冰箱。⑧化学物质安全橱，化学气体通过化学安全橱排放，用于操作一些易挥发的物质如甲苯、二甲苯和氯仿（和酚氯仿）。易挥发的放射性标记物也在其中操作，但需要审批。如果真的在化学安全橱中操作同位素，使用盖革计数器进行检测。⑨离心机，使装有液/固混合液的试管旋转，希望将混合物根据不同的相态分离开来，并可浓缩固相。有几种不同的离心机，以转速和离心管的容量来分类。**替代品：**没有实际的替代品，过滤能将某些材料分离开。**危险：**产生气溶胶和机械故障，离心生物危险品和有毒物质时，要求有好的技术、安全的离心方法及正确的仪器操作。机械故障会产生飞速的移动碎片，如果这些碎片脱离离心机的护罩，很可能会导致实验室人员受伤。

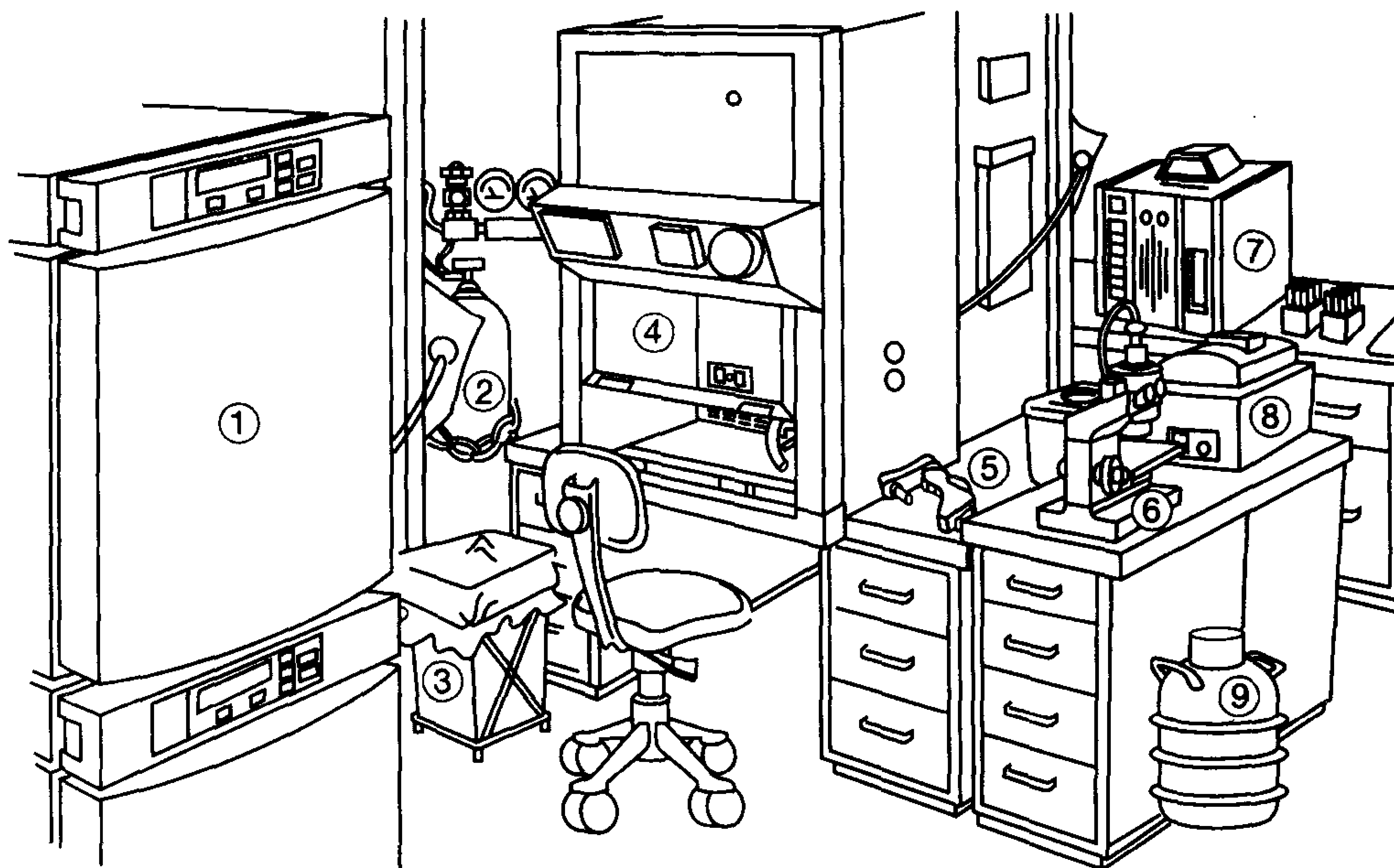


图 2-3　组织培养区

①CO_2培养箱，主要用于组织培养，为了维持培养基中的 pH 值或微生物生长需要足够的 CO_2，必须向培养箱中通入 CO_2 气体。**注意**：培养箱的蜂鸣声可能暗示着需要灌水或缺少 CO_2。**替代品**：可泵入 CO_2 气体或在溶液中自行产生 CO_2，在适当温度下培养。比如封闭系统中的缓冲液 HEPES 可用来代替 CO_2 维持某些培养基的 pH 值。②气瓶，实验室中的高压气体有很多用处，如培养箱需要的 CO_2，或破裂细胞的氮气。大多数使用的气瓶都有一个与阀门相连的调节器，能够关闭气瓶或调节气体外流的流量，无论是使用还是小心移动时，气瓶应该用绳或索捆扎常立在墙上。氧气或氢气的爆炸和失火相当危险，关于这些气体的使用，你应该从 EHS 处获得指导。逆时针方向旋转打开阀门。③生物危害品的处理，任何生命体或用于盛装生物体的包装袋在扔掉前必须灭菌。④生物安全柄，常需要用一个罩子或薄的流动罩。它有一股强制的气流，将任何进入工作区的灰尘和有机物的含量降到最低，薄层流动罩应该持续工作着（见第 8 章）。**替代品**：如果不要生物安全橱（即工作物质没有生物危害），那么干净的空气盒或者人员来往少、通风好的地方可用来进行组织培养。⑤移液辅助器，超过 1ml 体积的液体的测量和转移用移液管来进行，由于不允许用嘴来吸液，像自动移液器和吸耳球等被用来移液。⑥显微镜，用于放大观察组织、细胞和微生物，实验室常见的有两种设计：标准复合显微镜用来观察从培养基中取出放在玻璃片上的样品；倒置显微镜（物镜安装在物品的下面，而不是上面）能放大培养液中仍在生长的细胞和有机体，可以放在培养皿中直接观看，显微镜通常与荧光器和照相机连接。⑦库尔特计数器（也就是常见的细胞计数器），电子计数细胞或颗粒。**替代品**：可用一个显微镜手工计数细胞。⑧水浴，用于融化血清或进行酶反应，试管内含物在水中比在空气中能更快达到想要的温度。**替代品**：充满合适温度水的隔离冰袋能短期维持一个稳定的温度。⑨液氮罐，充满液氮的金属容器，用于长期储存细胞、病毒或微生物。

每个实验室都需要水源和洗涤区，有些设备应安放在易于接触到水槽的地方。大的设备，比如通风橱，将被放在任何可能放置的地方，许多器具常被挤到似乎不可能的空间里。

许多实验室被组织为功能性工作区，每个功能区都有它的规则。通常可能有一个组织培养区，那里只做一些细胞培养方面的工作，而禁止进行细菌和酵母的培养工作。生物安全橱是这个区域工作空间的中心，你会发现倒置和直立显微镜、CO_2 培养箱、低速和微型离心机、冰箱和储存的离心管、移液器、组织培养用的烧瓶及平板。

大多数实验室有一个**准备试剂的区域**，这里可以见到材料和用于称量药品的仪器，还有测量缓冲液 pH 值的仪器。



图 2-4　pH 值测定和称量区

①天平，天平用于称量。有好几种天平：台式天平是实验室用来称量大量固体和液体的最有效方式；有两个托盘的天平常用来平衡离心管；分析天平被用来称量少量精确份量的样品，重量通常在 1g 以下。②称量盘和称量纸，物品在放到天平上称量前，必须放在称量盘和称量纸上。③热盘搅拌器，配制溶液时，为使物质溶解需要进行些许加热。**替代品**：用手搅拌的热盘。④储备试剂，为了方便，用于配制溶液存放在实验室准备区附近的化学药品。⑤酸和碱，浓缩和稀释的酸或碱常用来调节溶液的 pH 值。⑥药匙和刮铲，用于从容器中转移固体物质到称量瓶中，一般为金属或塑料制成，常与称量盘和搅拌棒一起放在抽屉中。⑦pH 计，用于测量和调节溶液中的氢离子浓度。**替代品**：pH 试纸，通过估算来决定所加酸碱的多少，但实际上不可替代。⑧洗瓶，带有喷嘴的塑料瓶，可以挤压出蒸馏水来冲洗 pH 计的电极。

其他常见的功能性单位包括**显微镜区、电泳区、放射性实验区、细菌培养区或培养基和平板制备区**。

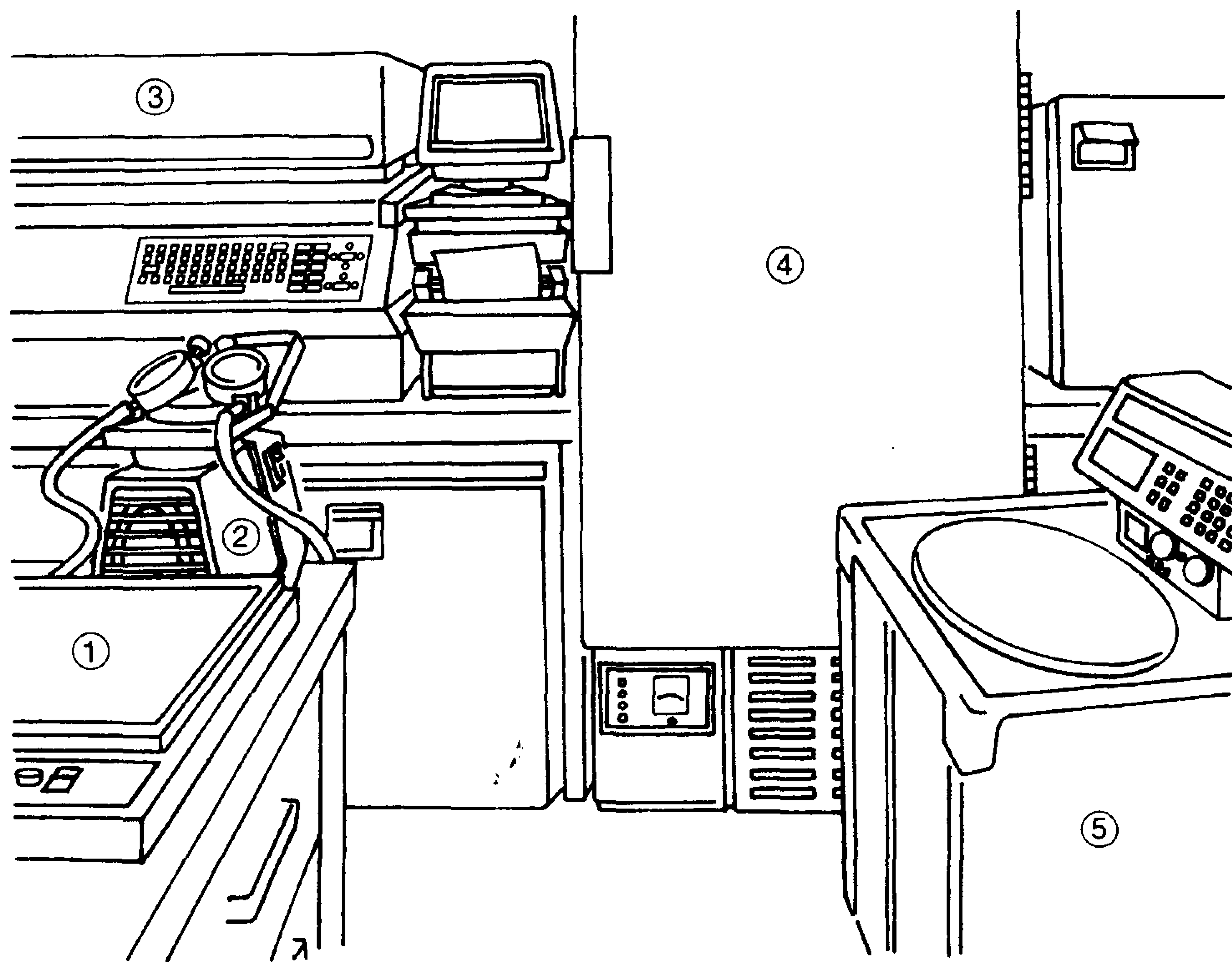


图 2-5 仪器室

①凝胶干燥仪，电泳后凝胶在真空状态下干燥以便能够进行放射自显影。**替代品**：干燥膜或真空干燥器。②泵，真空泵是实验室最常使用的泵，用来驱动一些仪器的运转，如冻干机和凝胶干燥器。**注意**：用油的泵必须小心操作，尤其是避免液体被倒吸到泵里面。要阻止易挥发性物质在反应中通过蒸馏进入泵中，随之进入实验室的空气中，冷凝管（充满液氮或干冰）可能安装在泵和仪器之间。比较新的泵不需要油。③闪烁计数器，计数样品中的β射线，通常计数的同位素是^{3}H，^{32}P、^{35}S 和^{14}C 。④低温冰箱（通常 - 70℃），冰箱可以是立式的或是卧式的，用于储存菌种、试剂和样品。**危险**：冻伤，在操作 - 70℃冰箱中的样品时至少要戴上乳胶手套。冰箱发出警报时千万不要走开，一旦冰箱熔毁，不仅会毁坏多年的工作，而且可能造成生物污染。**替代品**：保存细胞或微生物培养所用的液氮。⑤超速离心机，这种离心机能产生每分钟超过10 000的转速，用于分离和收集小分子如病毒和细胞器，因为要维持这样高的速度，超速离心机在使用时必须注意避免出现事故。

其他空间

实验区会扩展到主实验室或实验室以外的区域，放置离心机和其他大型仪器如冰箱和闪烁计数器的房间通常靠实验室非常近。这些房间可能只放一种类型的仪器，如离心机，但是大多数单位（特别是些老的研究单位）**仪器室**的设备往往杂乱地摆放着。有一些地方，安全法规允许一些大型仪器如冰箱放在走廊中，有些仪器如凝胶干燥仪和闪烁计数器在处理放射性物质样品时总需带手套操作。

高压灭菌锅常常放置于单独的房间内，有时就是**贮藏间**，这里可能还会有玻璃洗涤器、玻璃器皿烘干机、玻璃器皿储存处，甚至可能有配置培养基和平板区域。



图 2-6 贮藏间

①*移液管清洗器*，利用循环水清洗玻璃移液管。管子会用棉花塞住口，冲洗中厨房水槽下水口应放置滤网。②*玻璃洗涤器*，洗涤和干燥实验室的玻璃仪器。③*高压灭菌锅*，把材料放到高压饱和蒸汽中灭菌，常用于对玻璃器皿、培养基、缓冲液在使用前的灭菌和生物危害品在丢弃前的灭菌。**危险**：烫伤，在取出灭菌物或向灭菌锅内张望时，要等到锅内所有的蒸汽放完。**替代品**：液体可通过过滤灭菌，玻璃和塑料制品可用射线处理，但很少地方具备这种能力。④*制冰机*，当冰减少时，要不断制冰。用铲子来取冰，不要用冰桶直接取冰。千万不要吃这些冰块，别人的冰桶或取冰的容器可能已经被污染，冰中可能含有危害物质。⑤*干冰储存箱*，干冰每周发放一到两次，保存在一个箱子中，如果需要的话可以拆成几块，箱子旁边应该有木槌和手套，因为总是要用手来转移干冰块的碎片。

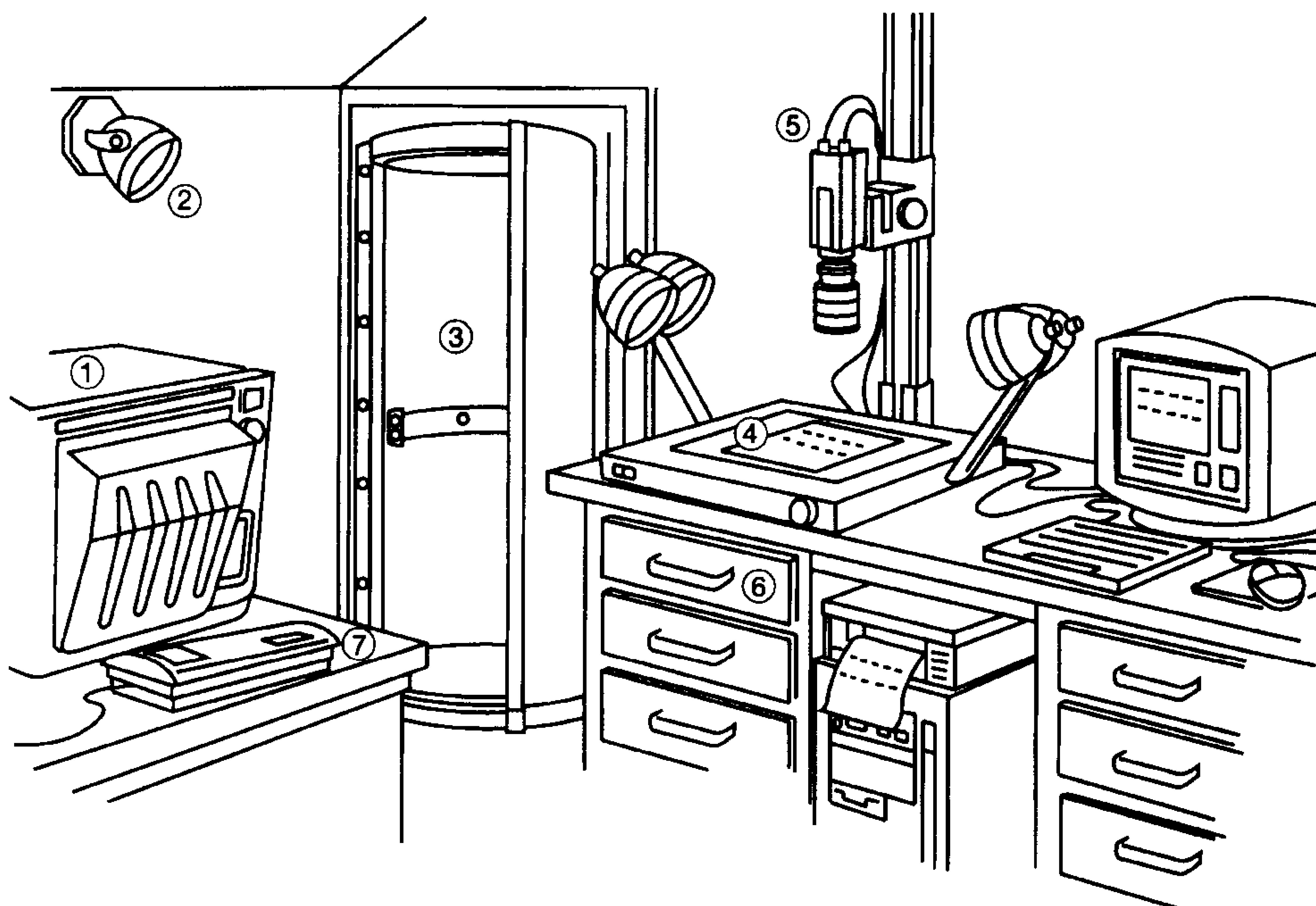


图 2-7 暗房

①X 射线片冲洗器，放射自显影 X 射线胶片的冲洗。**替代品**：手工冲洗曝光过的胶片。磷成像能在不曝光胶片的条件下记录放射性活性。②安全灯，红光不会使胶片曝光，但能提供足够的照明，当你进入暗房后，常用开关控制灯光，确信你知道哪个是安全灯的开关，哪个是常规灯的开关。③旋转门，旋转门允许你进出，但不会让光线进入房间。进门或出门时，逐步打开并慢慢推转，直到你到达进口或出口。开灯之前一定确信没有人在暗房里。④紫外线透照仪或光盒，可以观察 EB 染色的核酸和操作胶上的条带。危险：眼睛或皮肤会被灼伤，操作时一定要戴防护目镜，除非有护罩保护。如果你要操作凝胶，请用护罩，因为你的脸很容易被灼伤。割取条带时，手套与袖口之间的手腕最容易被灼伤。⑤数字凝胶成像记录系统，数码相机用于记录 EB 染色的凝胶上的条带成像，可以通过监视器聚焦和调节，用热敏打印纸通过硬盘打印。**替代品**：数字成像可以在计算机储存和分析，可用宝丽莱相机取代数码相机，密闭成像系统（也用于化学发光检测）可以不设暗室。⑥抽屉，X 射线胶片和宝丽莱胶片存放在抽屉里。即使 X 射线底片被包着，除非房间是暗的或是在有安全灯时，否则不要打开抽屉。⑦手提式紫外灯，常用于跟踪凝胶电泳核酸的位置。如果在实验室使用，放到合适的地方。

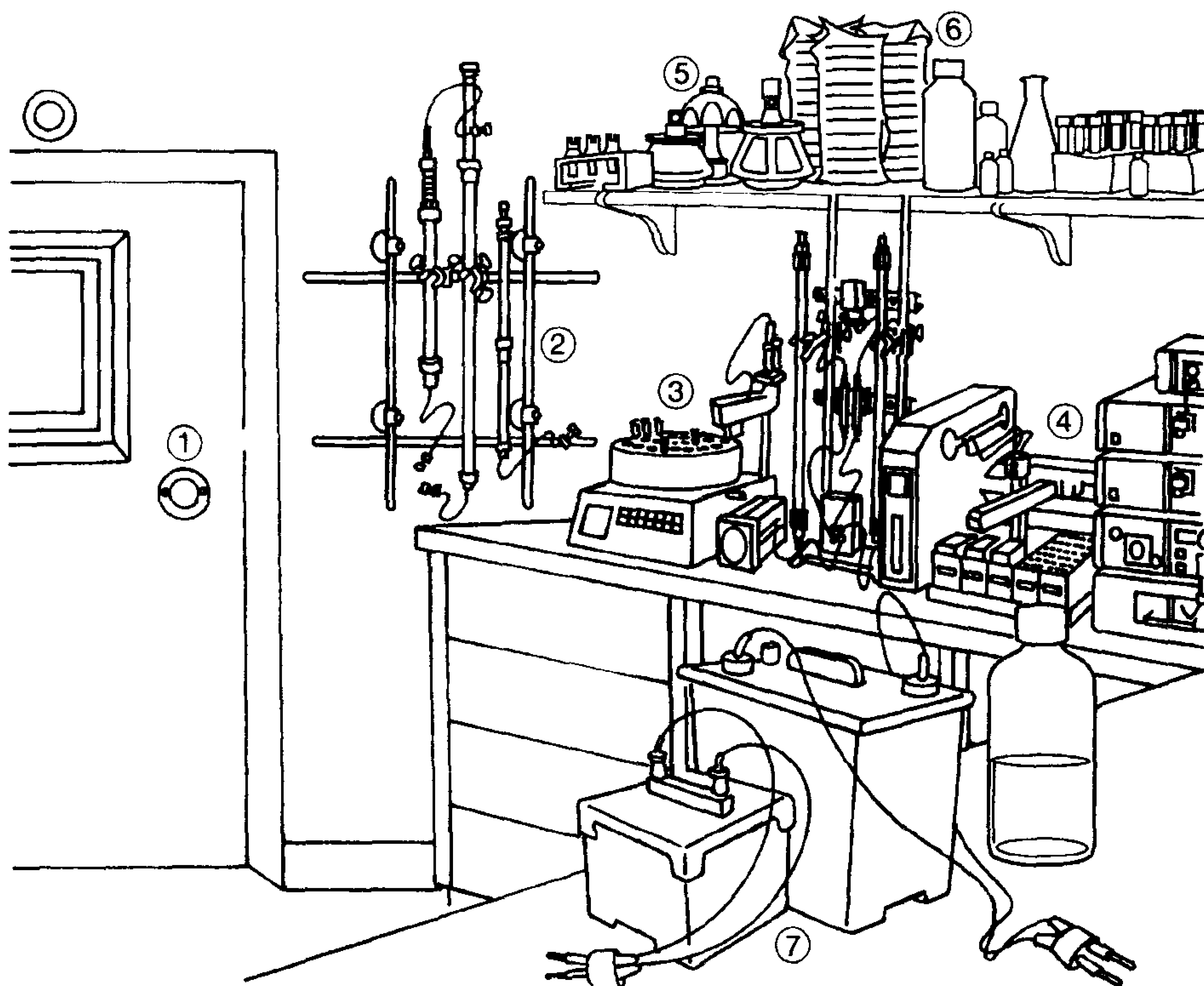


图 2-8 冷库

①门的球形把手，当某人在冷库工作时需尽量将门拉紧以维持温度，开门时用手掌或握紧的拳头按下把手钮或开关。②层析柱，含有用于层析的固体填料，这些柱子有的比手指还小，而有些几乎与冷库自身一样高。③部分收集器，部分收集器能够连续顺序收集从柱子中流出的液状样品。当样品滴从层析柱流出时，可即时将流出物收集到试管中，当收集到一定体积时，新管将代替老管继续收集。**替代品**：手工收集。④FPLC，自动的加压层析：高效液相色谱（HPLC）和加压液相色谱（FPLC）被用来分离及分析分子和化合物。层析柱是色谱系统的中心，在整个操作中（操作前、操作中和操作后）都必须小心对待，有数十种专门的功能。常与泵、检测器、自动上样器、注射器和样品处理分析的计算机一同使用。**注意**：HPLC 在室温使用，而 FPLC 常放在冷库或色谱冰箱中使用。**替代品**：带有部分收集器的重力色谱可以替代一些设备。⑤转子，用来放置和固定离心管，转子常保存在冷库中，以确保在运行之前保持样品低温。⑥配好的培养基，可购买现成的细胞或微生物的培养基，但需要冷藏。一些缓冲液和试剂也要保存在冷库中。⑦转膜箱，DNA、RNA 或蛋白质能够通过电泳从凝胶转移到膜上，在高电流转膜过程中，转移缓冲液会被加热，整个过程在冷库中进行可以减少产热。**替代品**：干燥或半干燥的电转膜仪。

大多数实验数据需要用胶片记录，离不开**暗房**。暗房有许多用处，当然暗房是用来冲洗和印制胶片的，但当大多数实验室将底片送出去冲印时，暗房的作用不大，主要作用是为安装放射自显影和其他化学荧光素胶片提供一个安全和黑暗的场所。微红的安全灯足以让人将胶片从片盒中取出和放回片盒而不用担心胶片会被曝光（确信你知道哪盏灯是安全灯，因为常规的灯光会毁掉底片）。有些实验室还在暗房中放置有荧光显微镜，即使房间不完全需要全黑。

冷库，可以在其中走动和操作实验，温度被保持在 4℃ 左右。冷库既可用于工作也

可用于储存物品。许多架子上放有平板、胶片、旧的细菌培养物、装有血清的瓶子，但大多数的空间用于放置离心机、凝胶盒和转膜仪等，因为有时候这些实验步骤要在低温下进行。门如果被关上了，不要担心，冷库里面有把手可以开门。

温室的温度维持在 37℃，或者维持在实验室工作的有机体适宜生长的温度。温室在空间上与冷库的相似，但含有用于促进生长和反应的设备。房间里到处可见用于加强空气交换以促进细菌生长的振荡器和旋转仪、堆放半固体平板的架子、可能还有生长杂交细胞和其他细胞系的旋转器。

有些系里将办公桌集中在一个房间内，称之为**办公区**，以取代将办公桌分散到实验室中。典型情况下，研究生（特殊情况下轮流学生）和博士后在这里都有办公桌。这里有普通用途的电脑和仅用于加热食物的微波炉。办公区是工作场所，但更加社会化，桌友需要相互适应和体谅。

系或组里的图书馆有相关的出版物、现行的和以往的各种期刊以及基础的指导教材。图书馆有双重功能，既可以是阅览室，也可以是休息室，可以在里面冲咖啡，也可能还放有复印机。

其他设备

实验台上的许多工作包括抽提物质或有机体，通过加热、混合、破裂或加入化学物质来改变这些物质，并分析原物质的改变。实验所引起的所有变化必须量化，一种信号——通常是光信号——被测定和被转化为数字信号。定量的仪器通常是实验室最复杂的仪器，你所看到的大多数设备有不同的测量和混合目的。仪器不可能都放在一起，它们会被分布在实验室或系里。

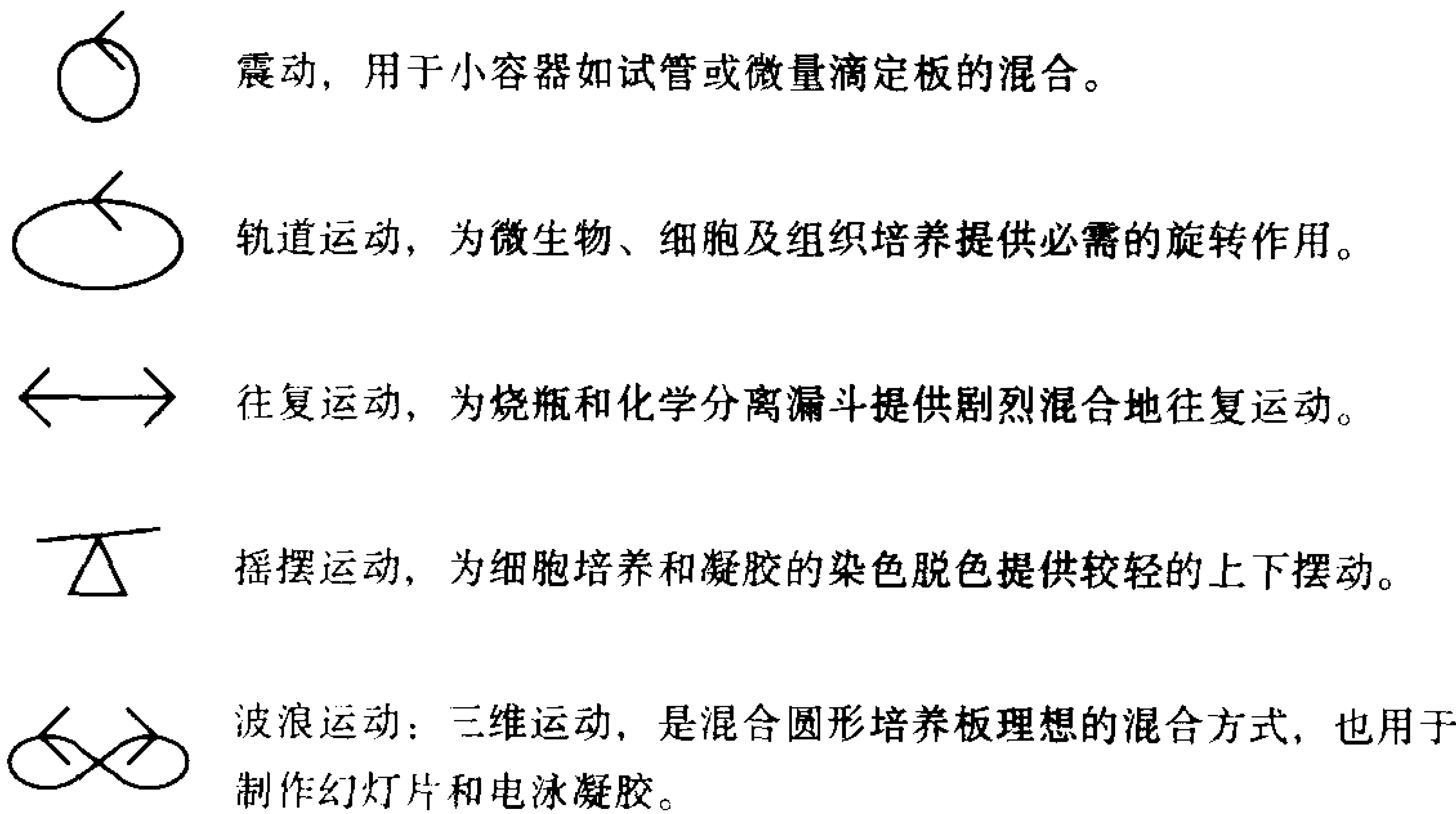


图 2-9A 振荡器和培养箱的运动，对于特别的应用来说某些运动比其他的要好，但大多数仪器能够适应你所需要的运动

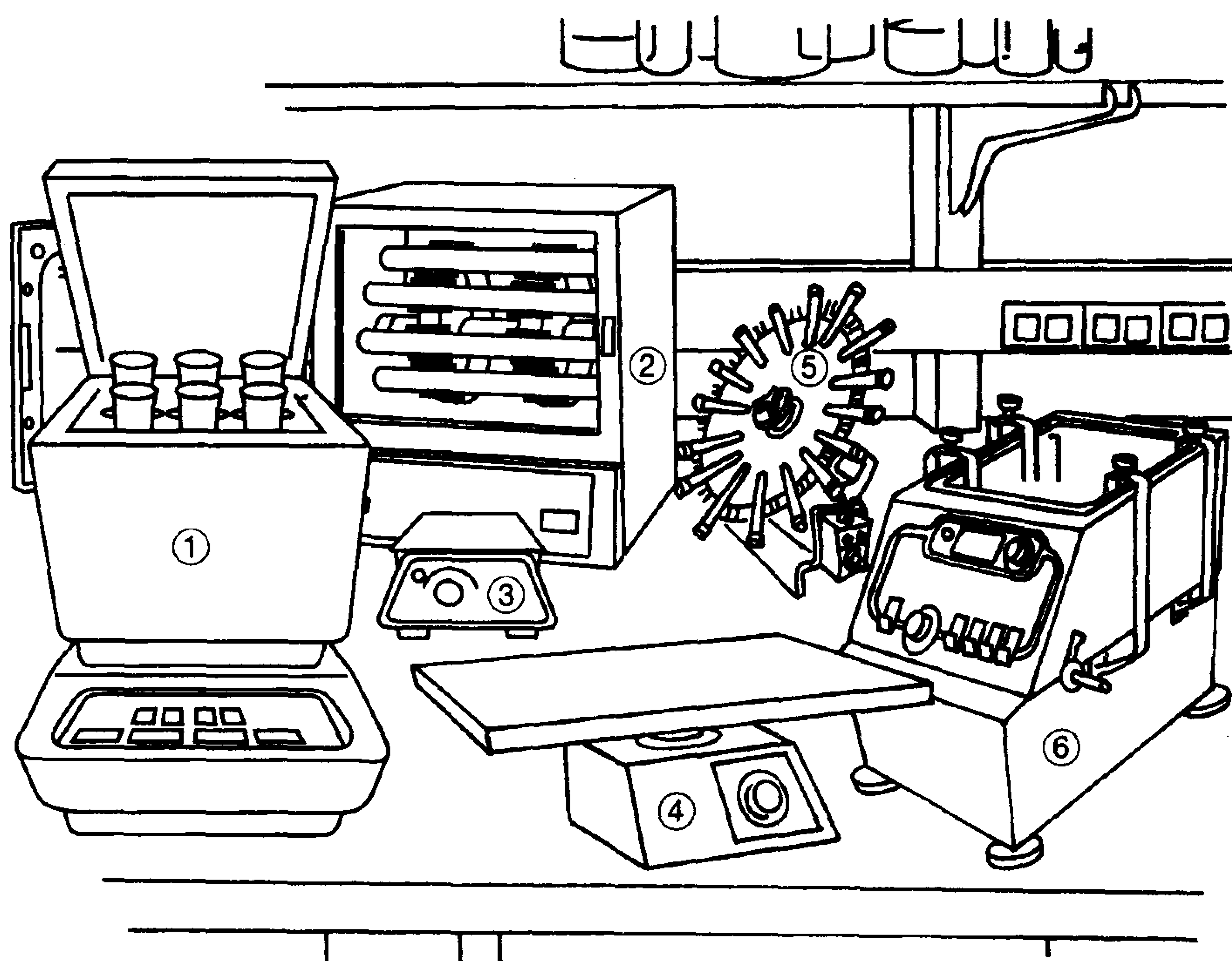


图 2-9B 混合和振荡

①**振荡培养箱**，主要用于培养细菌，振荡培养箱在维持设定温度下摇动烧瓶。**替代品：**温室中的振荡器。②**杂交炉**，用于杂交转膜，可以调节温度和转速，还有一些附件如平皿和管子。③**搅拌盘**，这种盘可以是单一热盘或单一磁力搅拌盘，但更加常见的是这种搅拌盘既有热盘也有磁力搅拌作用，用于煮沸和混合液体，最有可能发现它的地方是靠近 pH 计的地方。④**振荡盘**，一个带电动机的平板能够摇动，用于温和地混匀样品，特别适合微量滴定板。⑤**滚动轮**，一个旋转的轮子，尤其适用于细菌培养。⑥**振荡水浴器**，常用于杂交反应，也可用于微生物的培养，温度和转速可以控制。

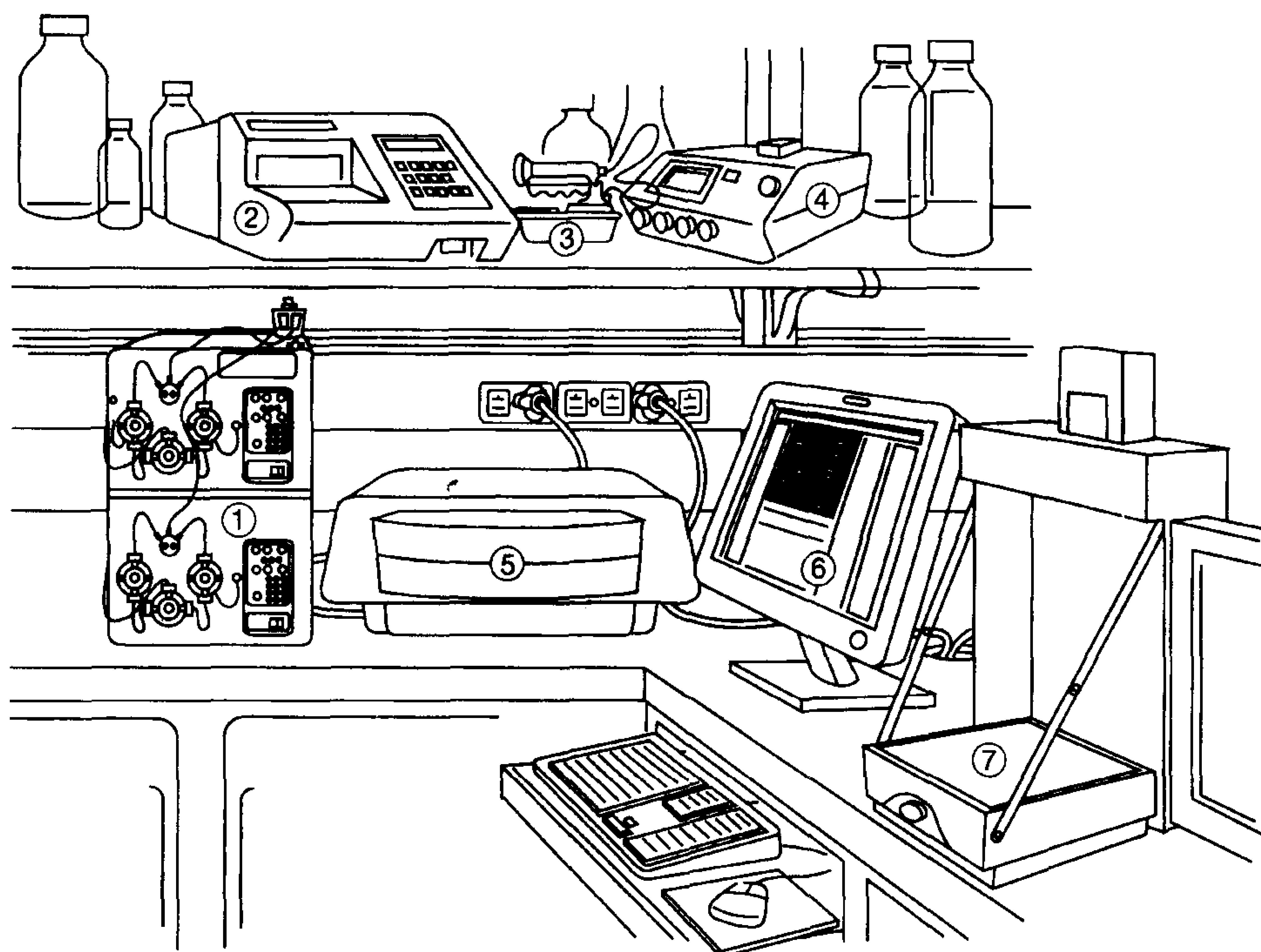


图 2-10　计量仪器

①HPLC，自动和加压层析，高效液相色谱（HPLC）用于分子和化合物的分离和分析。层析柱是该系统的中心，必须从始至终小心对待，有许多特殊用途。常常需要和一些专门的设备协调使用，如泵、检测器、自动上样器、注射器、还有用于样品处理和分析的电脑。HPLC 放置于室温，而 FPLC 常见于冷库或层析冰箱中。**替代品**：重力色谱。②*微型板读数计或平板读数计*，一般情况下，分光光度计可以检测穿过平板上（如 96 孔板）样品发出的光吸收值，常用于 ELISA、细胞毒素、细胞增殖和蛋白质测定的实验。许多实验室都采用平板而不用 96 孔板。**替代品**：在分光光度计中一个一个地记录数据。③*盖革计数器（离子室）*，**危险**：确信探测器是干净的（没有辐射），否则指示数会让你认为你和其他所有的东西都被污染了。**注意**：如果把指示盘的灵敏度调得过高，指示盘会给出清晰读数。**替代品**：虽然 γ 和 β 计数器能阅读，但是没有实际的替代品来监测现场工作区。④*分光光度计*，测定光透过溶液的透过率，用于测定生长曲线、DNA 和 RNA 的浓度、比色测定。光谱仪在大小、形状和复杂程度上有很大的不同，可见光和紫外光下测定需要不同的比色杯。**替代品**：Klett 管和细菌培养计数器。⑤*磷成像*，凝胶、膜、薄层层析平板或组织的放射性通过与磷屏进行放射自显影，成像再被收集和计数处理。影像被电脑计量和分析，曝光时间比标准的自显影胶片少得多。一个系可能只共享一台磷成像，但每个实验室或研究人员常自己购买磷屏。**替代品**：X 射线胶片放射自显影。⑥*计算机*，计算机是新型计量仪器中最常见的一部分，允许对实验调整和对数据彻底地分析，对于手稿产生、数据管理和储存以及电子通讯来说必不可少。⑦*成像系统工作站*，与数码相机和计算机连接则可摄像和分析软件，凝胶或膜上样品的化学发光、荧光和可见光被记录和分析，分子质量也可被计算。

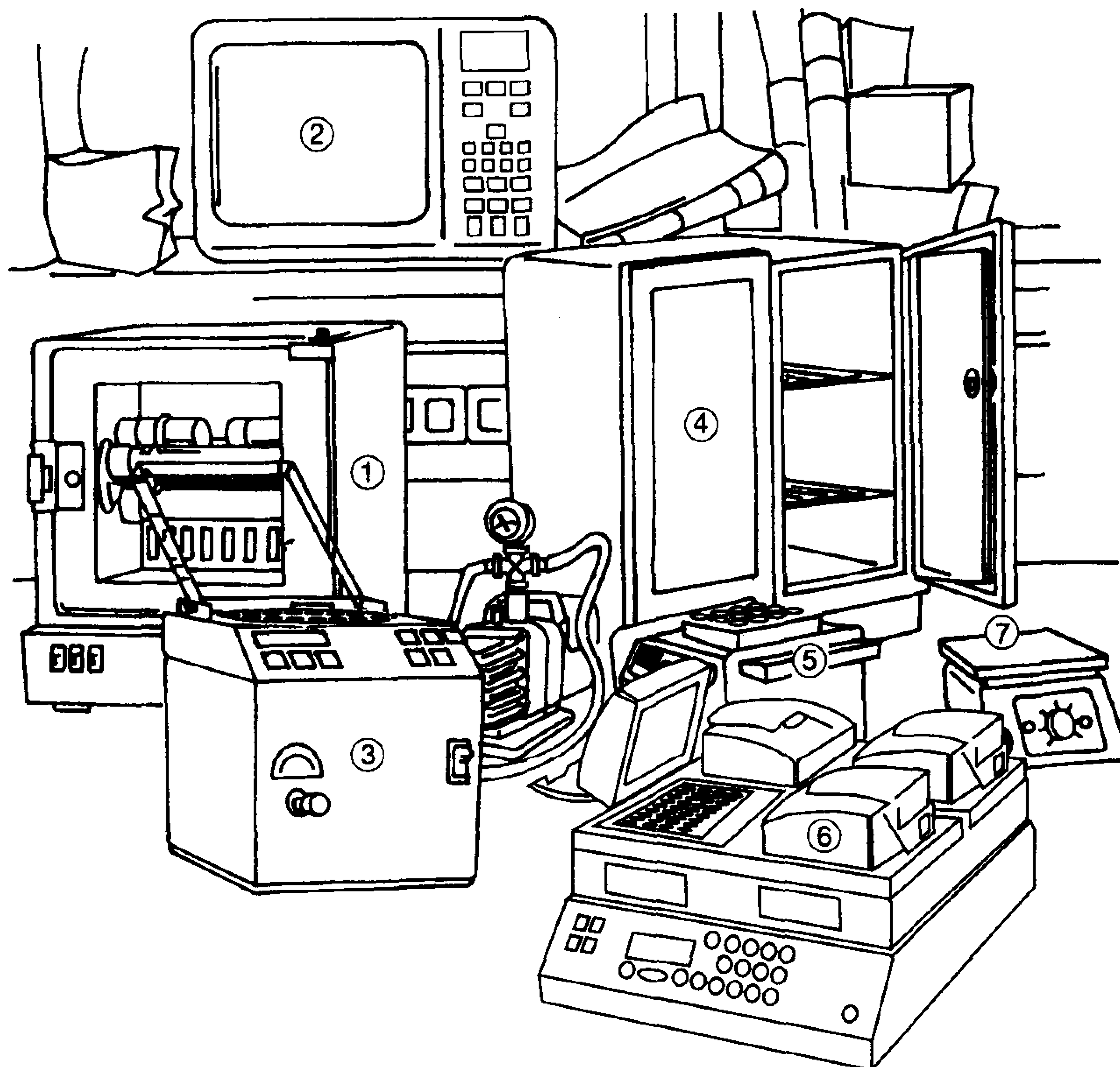


图 2-11　温度维持和控制设备

①*杂交炉*，维持设定的温度，转动大杂交瓶以温和的速度转动样品，常用于过滤集落、Northern 印迹、Southern 印迹和 Western 印迹。**注意**：确信管子在使用前是干净的。**替代品**：过滤器可以放于盘中在摇床和水浴锅中滚动。②*微波炉*，用于融化电泳凝胶的琼脂糖是实验室微波炉的主要作用。**危险**：琼脂糖凝胶溶液中常含有一种诱变剂 EB，在拿微波炉中的物品时要戴上手套；不要把瓶塞盖得太紧否则加热时会引起爆炸；不要用实验室的微波炉加热食物。**注意**：微波炉有许多不常见的用法，如溶解细胞、干燥膜和向膜上固定细菌等。**替代品**：琼脂糖溶液可用热盘加热。③*真空干燥器*，真空条件下离心，水或其他溶剂可以从样品中除去。典型样品是乙醇沉淀后的核酸干燥。**替代品**：真空房或简易真空泵，大的设备可以用于干燥凝胶和冻干大量物质。④*培养箱*，维持一个选定的温度。培养箱常用于细胞和微生物的培养，可与供气系统相连。其他的培养箱常用于样品准备，如过滤杂交。大多数培养箱维持在某一特定温度，不要在没有咨询其他人员的情况下改变实验室培养箱设定的温度，如果实验室有这样的习惯，那么最好留下一张便签。**替代品**：温室。⑤*干浴*，样品（管）在金属加热器或模块中可被加热到 100℃ 以上。⑥*温度循环器*，用于聚合酶链反应（PCR）中快速温度变化的加热装置，有些型号自身改变温度，有些型号通过机器人手臂将样品移到新的加热区。**危险**：PCR 仪有高的熔融温度，这一温度会烫伤你的手。**注意**：主要的问题是污染，要避免所有的移液操作或样品准备工作在靠近 PCR 仪的地方进行。**替代品**：无，这是一个奇特的加热模块，能够实现普通加热块所不能达到的快速改变温度的效果。⑦*热盘*，用于加热少量的液体。

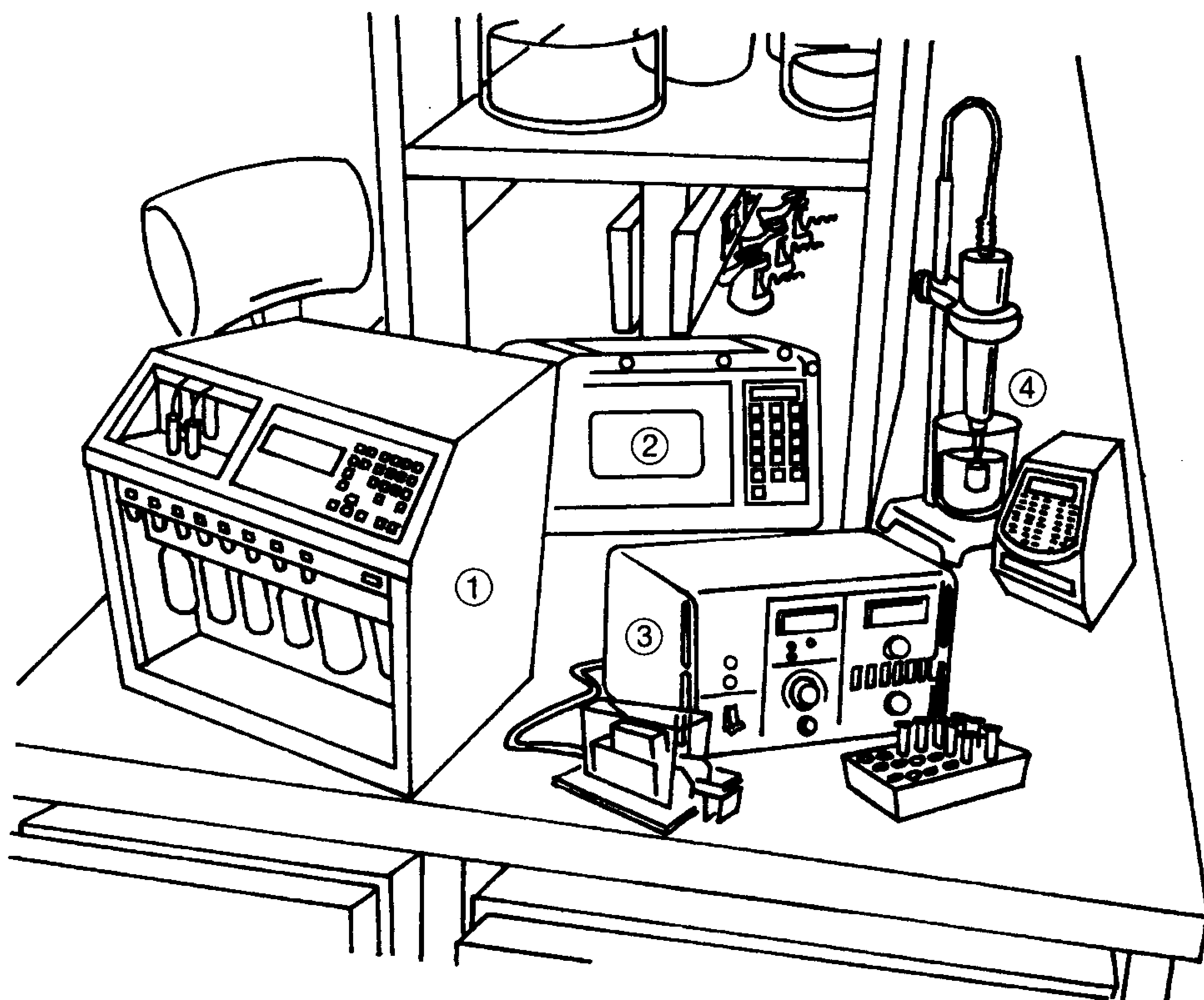


图 2-12 改变物质的设备

①DNA合成仪，实验室或系里需要的用于序列分析或突变的寡核苷酸可能是自己合成的，常有专职的人员操作机器。**替代品**：可以从许多公司订购已合成好的寡核苷酸。**危险**：所用的溶剂活泼，空瓶应小心处理。②紫外交联炉，主要用途是将核酸共价结合到膜上，也可用于突变和清除PCR污染。**注意**：看起来有些像微波炉。**替代品**：膜可以用来烘烤。③电穿孔仪，电穿孔仪看上去像一个电源，事实上，它可以说就是一个电源。电穿孔为细胞提供一个短期的电场作用，临时在细胞膜上开通一个通道，分子可通过打开的膜孔进入细胞。主要用于外源DNA的细菌转化和真核生物的转染。**危险**：这是一个高电压的仪器，没有指导不要使用。**替代品**：有几种化学或物理的方法可用于转化或转染。④超声仪（也称超声波处理器），超声仪通过发出高频有力的声波使生命物质破碎断裂，它们可用于裂解细胞和切断DNA。有两种基本型号，水浴式和探针式，探针式超声仪一般是最强的。**危险**：探针式超声仪可对耳朵产生伤害，一定要使用耳罩。**注意**：尖端直径越小，声波强度越大，保持声波尖头的清洁，否则会被损坏。**替代品**：将材料在小注射器中推来推去虽然不是很有效，但有时也能救救急。氮气气穴弹、去污剂、变性剂、还有酶都可以用于裂解细胞。

设备的使用

基本原则

- 让实验室人员**演示仪器设备的使用**，即使简单得像 pH 计一样。至少在实验室成员使用的时候仔细地观察，或者询问一下该仪器是否有特殊的规则，记下操作程序，可能你能闭着眼睛测量 pH 值（新环境恰巧可能是同一型号的 pH 计），但是你不知道这个实验室到底是把电极棒放在缓冲液中还是直接放在水中，人们是否轮流配制用于调节 pH 的酸和碱，当你使用完后搅拌棒子放到哪里……等等细节，如果忘掉的话，可能就会让实验室的其他人员急得发疯。
- 正常**清洗、归还、整理、关闭**你所用过的每一件仪器设备，不要改变设定，不要用力推那些不能动的把手和操作杆，不要忽视警报和闪光灯。
- **不要在未经征求实验室领导意见的前提下订购仪器**，如果实验室没有你需要用的仪器，其他人会告诉你（或者你自己发现）在其他实验室是否有这种仪器，他们会让你使用。
- **使用其他实验室的仪器要特别注意协调**，了解那里的人，找到他们最合适的能为你演示仪器的时间，并找到最方便你使用的时间。
- **对于实验室里的各种仪器（即使你没用过的），你也应该了解**：①它叫什么？是用来干什么的？②谁在负责该项设备？如果有问题找谁来解决？
- **对于每种你使用的仪器，你也应该知道**：①怎样操作？②仪器手册、操作指南或实验程序放在**哪里**？可能所有的指南或手册都放在一个中心位置，也可能会放在靠近仪器的抽屉里；③用完后是关掉还是整天开着？④使用前是否必须预热？用前不预热会导致不稳定的结果或减少仪器的工作寿命？⑤有没有使用签名簿？如果有，每次都要记录，即使你只使用了 5 分钟。

> 不要在没有说明书的情况下使用仪器，如果说明书丢了，打电话给制造商再获取一份。

- **对所有设备的警报立即作出反应**，忽视警报的存在会导致灾难性的结果。振荡培养箱上的警报也许仅仅是一个定时器，忽视这一警报会使培养的细菌过度生长而毁坏实验；忽视 CO_2 培养箱上的警报声会使 CO_2 全部用完，而 pH 值的升高会导致培养箱中所有的细胞都死亡；但如果 −70℃ 冰箱或液氮罐出现的警报被忽视，那么将给整个实验室造成最为严重的损失，冰箱的警报通常意味着温度上升，而液氮罐的警报是液氮面的降低，最终结果是冰箱或液氮罐中的保存物会融化，整个实验室储存的细胞系、病毒和重组细菌都会被毁坏，几年的工作将会付之东流。

> **你必须考虑你所使用的仪器。**仪器是你实验的重要部分，仪器的错误使用有时会以不明显的方式影响你的数据。不考虑你所用仪器的功能，你就会对为什么突然出现警报声毫无办法，或者连灯泡是如何被烧坏的你也不知道，一些最平常的问题往往是稍加考虑就能知道的。

- 分光光度计上的OD读数为零。灯泡可能没有打开，除了打开机器外，常常还有些事情要做，你可能没有选择正确的波长，也可能是比色杯不合适（并不是所有的比色杯都能透过所有波长的光），也可能你把比色杯放到了错误的样品孔中。
- CO_2 培养箱中覆盖细胞的培养基略带紫色，暗示pH值已经大幅度上升，CO_2 可能跑光了或提供湿度的盘子可能空掉了（你考虑过湿度是什么地方来的吗?）。没有湿度 CO_2 的读数会出现异常。
- 从病人患处取来的样品经革兰氏染色后的片子看不到任何的光亮，可能是光源烧断了，或者是控制灯光的隔膜被关住了，或是控制灯光强度的电位计也被关掉了。可能物镜被拧到一定的位置而导致没有光线传到视野里，或连接到照相机而导致光线被传到照相机处而不是视野里。

听到警报声该做什么?

1. **确定警报源**。即使你必须马上去另一个实验室或系，也要先确定警报来源，在知道有人来处理前，不要关掉。
2. **通知负责仪器的人**。问问实验室的人或者查询一下责任单（如果实验室有责任单）。如果责任人在家里，即使是凌晨三点，给他打电话。一旦负责人被找到，你就可以轻松了，如能提供帮助，请站在一边。
3. 如果你找不到负责人，**找一个比你懂得多的人**。不管你信不信，这也许不可能，但一定要试试。
4. **如果你被留下来处理警报**

- 首先，确定是否是**安全问题**。一种情况可能是一些设备损坏，导致放射性物质的泄漏，打个电话给EHS和实验室安全员。另一种情况是，超速离心机明显的不平衡，碰到这种情况，你应该打电话给实验室安全部门，不要试图亲自处理有危险的仪器。
- 确定是否是**实验室的紧急情况**。可能是－70℃冰箱的温度上升，这可能会毁坏整个系里的研究成果，你不可能单独处理这件事，打电话给实验室的安全员，如果你找不到他，打电话给实验室安全部门。
- 确定是否属于**实验紧急情况**。某人的结果会不会被毁坏？检查涉及的材料，找出材料的所有人，如果你认定是谁的东西，打电话与他联系。如果不是，检查实验后决定将实验材料放到何处（见第8章），仪器可事后处理。
- 如果没有危险，关掉警报，在仪器上贴张便条，以便别人不再用它进行实验，给负责人留条。

> 除非你检查了情况，否则关掉温度和空气控制装置，这样可以保证温度或气体混合物稳定数小时甚至过夜。

如何购置新设备

1. **如果你需要设备，谨慎决定**。是否可以用你已有的仪器？你能否长期借用该仪器？

该仪器是经常使用还是仅仅为了做一套实验？即使资金不是问题，也不能因为一时兴起而购买仪器。

2. **比较可供选择的型号和生产商。**

- 查看综合性医用设备供应商目录，如 BioSupplyNet，比较供应商。
- 让同事看看他们是否用过特殊的型号并作推荐。
- 浏览一下展会上的卖方，看看能得到什么。除非你已经研究过这个主题，否则就不要购买，即使你得到过合理的解释。
- 将关于仪器的问题张贴在日常布告板上。
- 询问公司购买过该产品的人名和联系电话，给其中的一些人去电话问问他们对购买的仪器是否满意。

3. **决定一到两个你喜欢的型号。**要求对最后决定的产品做一次示范和试验，试着在同样的条件下进行自己的实验。找出有多少技术支持及供应商提供的服务。
4. **对你最终的选择作最后的安排。**注意随机附件或配件，你还需要安排增加些什么。有些公司为吸引你购买他们的产品，会提供免费软件、课件、配件或维修合约。在谈判时不要害羞，如果价格不是问题，你可能会轻松很多。
5. **尝试着购买仪器。**如果可能，你实验室的购买部门会处理此事。
6. **试机并与公司保持联系。**问一些问题并运用他们的专业技术，这应该是你选择某种特别仪器的一个原因。有些公司甚至会提供实验程序和通过电话联系为你解决所有的难题。

（赵迎春　王维荣　黄伟达）

参考文献

BioSupplyNet
http://www.biosupplynet.com
The web site allows you to search by key words for product names or categories, as well as for best deals. A comprehensive directory of biomedical research supplies and equipment on the web.

SciQuest, Research Triangle Park, North Carolina 27709-2156.
http://www.sciquest.com/commerce/CommerceRouter/Index
This web site also allows searches by key words, and automatic requests of chosen vendors.


PROTOCOL

第3章　开始与组织

你的实验台就是你的家，你真正的财产，它的建设和维护是你实验创造的一个部分。不管你自己的风格如何，试着控制并保持实验台的清洁。放下你的所谓男子气概及一个真正的科学家往往不要清理废弃旧物的想法，至少在你做第二个实验之前清理掉前面实验的废物。

实验台上将做些什么？难道你在实验台上只是准备凝胶分析的样品或者跑凝胶电泳？实验室是否有一个公共的场所可以专门用来跑电泳？尽可能地利用公共区域使你的实验台空间空出来，压制住在实验台上做所有事情的冲动，那会把实验台弄得很乱。

组织是关键。已不再可能获得大量现成的科学信息，只是希望知道如何和什么时候获得自己所需要的东西。如果没有一个保存参考资料、数据、电脑文件和期刊文章的系统，在几周内你会对论文工作一筹莫展。在实验室中保持对信息的控制与你的智商同等重要。

建立一个功能性的实验台

感觉一下好像你真地进入了实验室，建立你的实验台，以致你可以尽快开始你的实验。了解你将要工作的内容并精确配制你所需要的专门试剂可能需要花费你一个星期多的时间。

1. **简单估计一下你需要的物品。**环顾实验室，考虑一下将要进行的工作种类，对你的实验台所需之物列出一张（可能的话）清单。
2. **找出实验台可以提供的物品。**通常当你走进一个新的实验台，你会继续使用以前实验台使用者的仪器，检查一下，能用的就接着用，以后如果不够了，你再替换它。如果不是你习惯上所要使用的，如人们倾向于用一种特殊的移液器设备，可以尝试着用老的。

> 不要用开过口的箱子或材料袋。如果你发现开过盖的移液头、移液器或试管，那么只有通过高压灭菌锅灭菌后才能保证它们的清洁和无菌。

3. **丢掉你不用的器具。**你需要使你的实验空间最大化，在整理实验台抽屉和橱柜时，扔掉不用的东西，问问其他的实验室成员看他们需不需要，或者把它做上记号放到手推车上以便让需要的人取走，一周后如果没有人要就扔掉它。
4. **清洗。**你要尽可能使物品清洁，用肥皂水擦洗实验台和实验架并用水冲干净。清洁时戴上手套，可能会有残留的放射性物质和化学危险品。

> 立刻倒掉你实验架上的所有缓冲液，如果用了这些缓冲液，可能会使你的实验中断，因为你自己确实不知道这些缓冲液是否能用。

在你建立实验台的过程中，更多的时候你会制造许多要扔掉的废物，不要乱扔杂物，除非你看过了实验室关于处理废物的特殊规则。破坏了废物处理规则，实验室会被实验室安全部门关闭。

第8章叙述了废物处理的特殊规定，但是你必须了解下面的各种垃圾有其各自的处理方法和处理场所：

纸、可回收的垃圾

生物废物

放射性废物

破碎的玻璃

注射器、针头、巴斯德移液器

化学废物

危险性化学废物

5. **订购实验室常规用品。** 有保留地订购（大多数实验材料和设备都在实验室中），你可以一边做实验一边订购，现在只订最小量的就行。（如果有专门负责订购的人）向负责订购的人请教，或者从其他成员处获得指导。核查你的预算，即使没有限制，你也最好只订购你绝对需要的东西。看看后面的介绍找到订购的方法。

除非你和P.I.讨论过，否则不要订购大件仪器，试着去借你所需要的任何仪器。

6. **尽快做个实验，重新估计你所需之物。** 一个小实验的建立和完成会告诉你所需之物，所能借的东西和一些错误的事情。现在可以开始订购你特殊实验所需要的物品。

尽快准备你的第一个实验，不要等到所有东西都齐备才开始，第一周就开始做实验，即使你需要借用仪器。

如何订购设备和试剂

1. **确定如何合理地订购。** 订购程序会因不同的单位有所不同，你的责任可能仅仅是报告要订购物品的名称也可能是亲自打电话订购。多数单位会有商店供应最普通的订购物品，这里的订购程序与外面订购的可能不同。有些单位通过采购部集中订单采购，这样的部门负责电话联系采购和处理所有实验人员的书面申请。采购部还有责任根据你所需要的物品去选择最合适的制造商，如果你需要特定制造商的产品，应该在订购单上特别强调。

你起初实验所需的大多数标准材料都会储存在实验室中。

越来越多的单位开始在网上订购，如果你所在的实验室是这样的话，你需要一个密码和账号（你所有的订购都会需要这些）。订购可能需要几天的时间，在订购时要提前安排好。

2. **确信实验室的确不存在或者还没有订购该物品。** 好好检查实验室的试剂柜或试剂瓶，看看有无备份，问问采购员是否已经订购，或者问问其他成员。

3. **如果所订购物品是标准的，订购确切的标准和通常订购的数量。**对于化学试剂来说，空的试剂瓶本身就是最好的订购信息。对于其他产品，咨询一下负责订购的人或实验室的其他成员。

4. **如果所购物品在实验室订购单中初次出现，按下列步骤做。**

- 与给你实验计划或配方的人核实需要的那些产品。试剂的来源可能是关键，尤其是在你试图重复实验结果时，曾用过这个试剂的研究者能给你有关该试剂的类型、生产商甚至储存等最好的建议。
- 如果实验程序对试剂的来源没有要求，询问做过相似实验的人，让他推荐一个生产商，你还可以问采购部或负责订购的人，让他们建议一个生产商，然后给生产商打电话。网络服务可查询到任何的产品、比较价格和标准。从生产商那儿索取产品信息，其中的一些被列在本章结尾的参考文献部分。你也可以在网上浏览众多的生物医学科学的公告牌，给那些用过该产品的人们提问题，也可以向销售代表寻求帮助。如果你的人际关系好，大多数人会很乐意告诉你某产品的适合度及局限性，好好收集这样的信息。
- 购买最小的数量。试剂的单位价格常随着订购量的增加而显著下降，但如果试剂不能很快用完就会变质，而成为一项昂贵的支出，抵制购买大量产品的冲动。
- 购买你能承受的最高产品质量的物品。强调的是需求。有些试剂有不同的纯度，价格越高的试剂纯度越高，但最贵的级别并非最适合，而且可能会得到不同的结果。如果没有特定要求的级别，打电话给生产商解释你所需要的产品。
- 对订购的产品作好记录，这会使再次订购变得更为简单，在你的研究笔记中，在相关的实验中记录下订购电话和订购数量是个好主意。

5. **以最便宜和最安全的方式运送产品。**例如，你可以选择用干冰或湿冰来运送酶。根据生产商的建议，采取必要的保护措施，避免“紧急”订货。

> 如果实验室有老资格的技术员，问问他们订购产品和建立实验台的建议，这样的人常常是很有价值的资源。

> 你必须决定你将如何与销售代表打交道，大多数研究者认为与他们谈话确实是一件痛苦的事情，许多单位和公司不允许销售代表上门打搅。但一个好的销售代表能给予你很大的帮助，其中的大多数人经过了生物科学某个领域的专门训练，他们能帮助你作出决定和减少费用。销售代表时间很紧，礼貌对待所有的销售代表，决定要与谁交谈时要有所选择。

> 例如，牛血清清蛋白(BSA)能够用来阻止非特异性的蛋白质结合到滤膜上（在其他用途之中），或者稳定一个酶反应。对于后一种用法，任何污染都会抑制酶的活性，这时的BSA必须要求纯度更高。

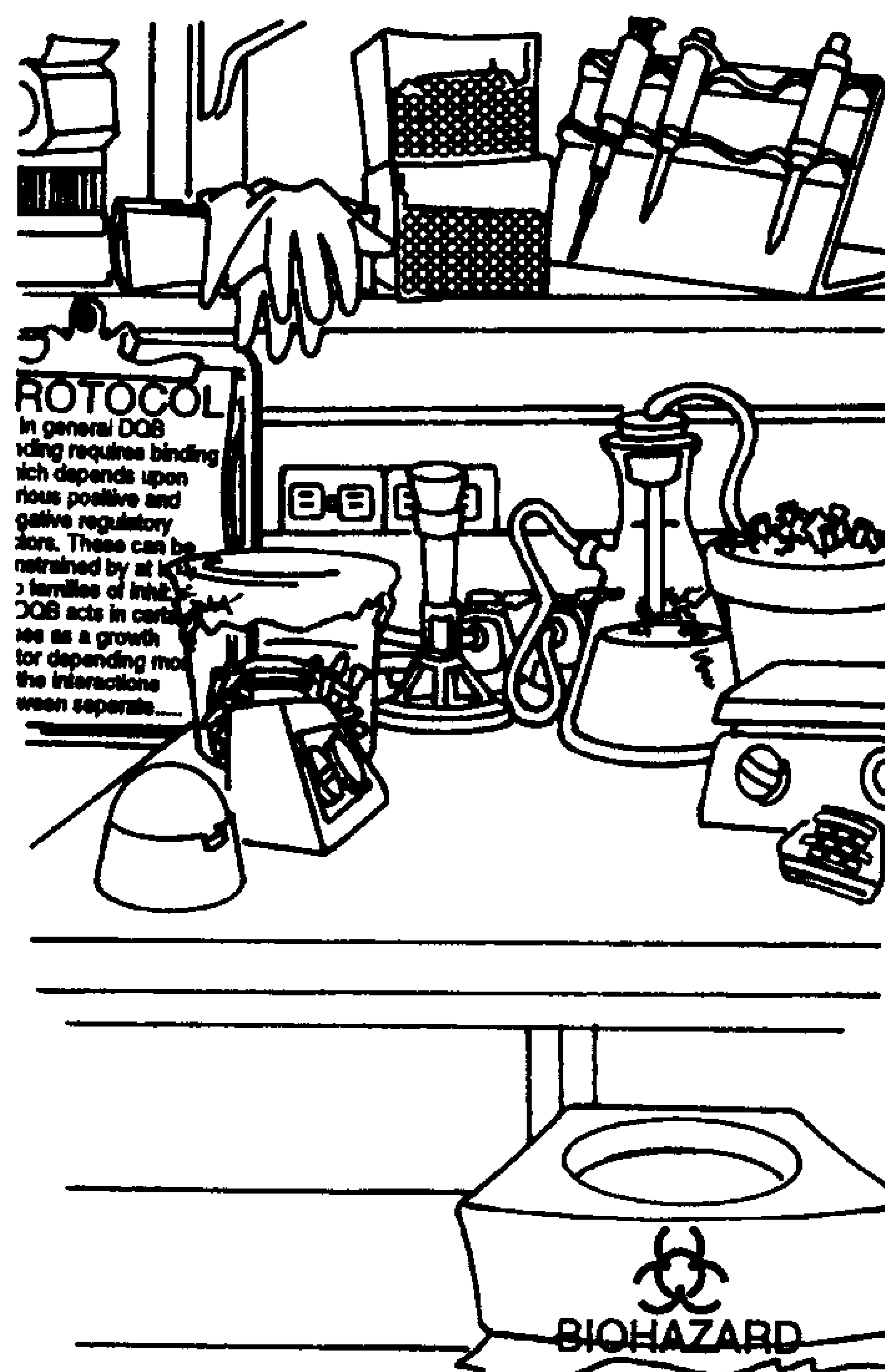


图 3-1 实验台应该有一个中心工作区域，四周放实验所需的仪器和材料

实验台需要什么

空间

至少有两英尺全部干净的实验空间用于实验活动，不要把任何东西堆放在这个区域。每项实验完成时记得清理实验台上的残留物，保持这个完整的空间。

有些人用蓝色的“尿布”或特别的实验纸（这种纸一面吸水，另一面是塑料）覆盖实验台，如果这样做，吸水面应该向上，所用的实验草纸需要经常更换，否则是没有用的。

> 你可能会一次放下几层实验用草纸，当上层弄脏后扔掉上层。

如果你在实验台做一些放射性的工作，必须用有塑料背面的纸来覆盖实验台，并且每次实验都应覆盖，实验结束后都必须拿走所盖的纸。

架子

个人室温放置的试剂放在实验台上，实验室新来者首先应该做的就是配制开始实验所需要的缓冲液。

> 如果架子将实验台分成两部分，确信你不会将试剂瓶碰翻到邻坐的台子上，不要在架子上存放酸、碱或其他具有腐蚀性的试剂。

存放在实验台上的典型试剂

10×PBS（磷酸盐缓冲液）
溴化乙锭（EB）5 mg/ml 水溶液
10×TAE 缓冲液
10×TBE 缓冲液
10%SDS
20×SSC
1 mol/L Tris，pH7.0、pH7.5、pH8.0
0.5 mol/L EDTA，pH8.0
3.0 mol/L 醋酸，pH5.2
5 mol/L NaCl
5 mol/L 或 10 mol/L NaOH
10×Laemml 电泳缓冲液

你可能需要冷藏的试剂

氯仿/异戊醇
水饱和酚
酚/氯仿/异戊醇
RNA、DNA 或蛋白质凝胶的上样缓冲液

参见第 7 章缓冲液及试剂配置方法和常用试剂配方。

> 大多数缓冲液须灭菌后室温保存。

实验台和抽屉：清单

虹吸器　一种用于吸取液体（通常是上清液）的设备（真空或泵产生虹吸）。

生物危害品处理包　所有与活有机体接触过的可处理的材料必须作为生物危害品处理（第 6 章）。在靠近实验台的地方有一个大的罐子或容器用来盛装生物危害品。实验台上放袋子的小容器没有必要，但能使生活更加轻松安全。

热板搅拌器　在凝胶电泳前可用来煮样品、搅拌难溶的试剂、驳离滤器，较容易操作！

冰桶　这是实验室常用的物件，但你早上做得最多的第一件事情可能就是装满冰桶待用，保证你始终有冰用。

实验服　每个单位可能都会提供给你一套或多套实验服，大多数实验服都会洗干净。有些实验室仅用可处理的纸制实验服。实验服是为做特定工作时准备的，但为了你的安全并可延长你牛仔服的寿命，做实验时必须穿上。做放射性的实验时你需要一件单独的实验服。

乳胶手套　乳胶手套有沾粉和不沾粉两种，在你订购之前，尝试几种不同品牌的手套，因为许多人对某种类型敏感或过敏。确信你订购的大小合适，太紧会伤手，太松会使移液器的精细操作变得困难。用过的手套应作为生物危害品处理。

微型离心机　可能比你希望的还多，一旦你拥有一个，你将一直都在用它。可能会是一台 6 孔的小型私人离心机，但离心速度不快，不能用于核酸的沉淀。

微型离心管架 3～4 个架子能使你同时进行几个操作，把它们放在抽屉里面，以免丢失。

密封用石蜡薄膜 这种可拉伸的膜常被用于密封平板或试管的封口，因此放在实验台上备用。有的用切边机切，有的用剪刀或小刀剪切，保持它们在膜盒边上待用。

巴斯德移液器 无菌的和吸耳球，你可以用一次性的转移管，它可用来填充和平衡离心管、移取上清液和移动小体积的液体。

移液器 0～20μl、10～100μl、50～250μl、10～200μl 或 100～1000μl 各种规格。如果你得到一套，需要校正。这些移液器可以保存在整洁的抽屉里，但最好购买适当的移液器架子或者用 50ml 的塑料离心管作成挂钩挂到架子上。

吸量管 你需要一些玻璃吸量管测定溶剂和其他液体，将吸量管保存在高压灭菌桶或灭菌罐中，常用的型号有 2ml、10ml 和 25ml。尤其在你做组织培养实验时，多数使用的吸量管应该是一次性的或可以灭菌的塑料管。如果你不经常用，那么购买一套有单独包装的吸量管，如果经常需要则可以买较便宜的批发包装。

移液辅助器 因为不允许用嘴吸移液管，你需要用工具来提供吸力，吸耳球很管用，但自动移液器更可靠和更易使用。

记号笔 保持一支在你的实验台上，在笔筒上作个标签写上你的名字，否则在你需要时你就找不到它了。

洗瓶 一个装有蒸馏水的塑料瓶，用于平衡试管等，或装 70％的乙醇，用来消毒试管和喷洒清洁实验台。每个瓶子上用标签标记是什么内含物。

灭菌微量离心管 装在一个有盖的烧杯或一个可高压灭菌容器中，至少要有两种容器用来装你常用的微量离心管，1.5～1.7ml 和 0.5ml 两种型号的最为普遍。

移液器移液头 虽然你可以购买预装移液器吸头的盒子，但是许多实验室都手工装移液头。每种型号最好有 3～4 个盒子，不是任何移液头都适合所有的移液器，因此好好检查移液器的生产商来使用合适的移液头。

标签带 如果你的实验台有足够的空间，可以设定多个独立的标签区，这样你就能较容易地找到不同颜色的标签（用于标记不同的试剂）、透明胶带（用于保护写在微量离心管上的字迹）、高压灭菌标签（贴在各种要灭菌的物体上）和生物危害品及放射性物品标签带。如果空间受到限制，在抽屉内保存一卷标签带。

定时器 无论你要给玻片染色 1 分钟，还是作一个 2 小时的酶切反应，你都应该设定一个定时器。选择那种有多个频道的，这样你就可以同时给 2～3 个不同的实验定时。许多定时器背面都有磁性，可以吸在金属架上，或者用一个夹子夹在你的实验服上。

移液头/针尖处理盒 移液头和巴斯德移液器会戳穿塑料袋，应该用另外的容器单独收集。可以用一个注射器或针头的处理盒来装所有的锋利物，或者用一个放在容器或烧杯中的小袋来收集，询问一下实验室安全人员对针头、注射器和其他锋利物的处理建议。

涡旋器 常放在实验台上，多种型号的多个管子适配器非常有用。

移液器、移液管和移液辅助器

移液器

实验室有几十支移液器，因此你能够找到适合你要用的一支，其中有一些是可以一个按钮完成取样、加样和弹弃移液头的；另一些有为各种功能装配的专门按钮。有些移液器可以在实验室校正，而有些则必须由专业人士校正。多数移液器能够灭菌，适合于病原生物的转移。

> 对于多数的移液器，按钮应该按两次将所吸物品转移，按到你碰到阻力后再轻轻按一下，这最后的一按可将最后的一点点样品彻底按出，还带有一点空气，因此必须尽可能轻地一按，以免产生气雾。

除了提供特别范围的移液器外，移液头也有很大的选择性。将灭菌的移液头放到摇瓶和广口瓶中，移液头延伸使得移液器被用来进行组织培养实验。长的平滑移液头被用于凝胶电泳测序的加样，另一些移液头有滤器，能阻止样品从一管到另一管的污染，特别适合于PCR、有传染性和放射性的样品。

可调整体积的移液器 很好的实验移液器，适用于各种移液操作。

电子移液器 可以编程控制操作一系列体积的移液和用于稀释。

固定体积的移液器 固定移液器是为特别实验准备的精密仪器，每次分配样品的体积是相同的。

多道移液器 可同时分配几个样品，常用于微型板，有4、8或12个出样孔，可以是固定的、可调的或重复出样的。

正取代移液器 有一个正取代的移液机制，液体和活塞之间的空气被清除，这种移液器极为精确，其取样体积不会因表面张力、黏度、蒸汽压力或密度因素受到影响，尤其与过滤枪头一起用。适合于PCR、放射性和生物危害品的移液，不会形成喷雾或污染样品。

重复移液器 用于重复性的样品分配，通过与储蓄池相连，不需要重复吸液就可以多次进样。储蓄池可能是个注射器或水瓶，通过和移液器相连的管从其他容器泵入，也可以是一道或多道的移液头，能分配固定或可调体积的样品。

移液管

毛细移液管(也称之为微型移液管) 小的玻璃管通过毛细作用或吸耳球的吸力移取毫升级的样品，主要用于薄层层析、PCR或电泳上样。

刻度移液管 与血清移液管的样式和用法相近，但开口更小。

巴斯德移液管 玻璃管，有种类和管头长度不同之分，通过移出和转移液体适用于平衡离心管，可以用棉花塞住，常于真空吸气管相连使用。

血清移液管 你每天使用的标准移液管，大多数用途和测量移液管相同，有许多型号可以选择，如玻璃的、塑胶的、可重复利用或一次性的、可塞棉花或不可塞的、单包装的或与吸耳球一起包装的或自组装的。玻璃移液管适用于有机溶剂，可以灭菌，通常塑胶移液管适用于组织培养物。每个实验室都有一套选择和处理移液管的系统，多数移

液管用于分选特定的液体（常标有 T.D. 表示用于移送移液管中的样品，也有标记为双环），选定刻度的液体全部移出时的体积为选择移液体积，其他移液管（标有 T.C. 表示包含），仅在液体释放到某个选定点的体积为移送液体的体积。

转移移液管　一次性塑料制品，带有吸耳球，适合于平衡离心管和转移可能沾到玻璃上的细胞和物质。

测定体积的移液管　校正后用来分配一个特定体积，在大多数实验室都不常用。

移液辅助器

移液辅助器是为常规移液管（玻璃的或塑胶的）提供吸力的工具，也常与巴斯德移液器一起使用，但是与像巴斯德这样短的移液管一起使用会导致液体被吸到辅助器中。

吸耳球或移液管漏斗　吸耳球是防化学腐蚀的，技术含量较低，却是很有用的设备。移液时，先排空气，挤压阀球上部的 1（或“A”，吸气的简称），然后捏压球杆上的阀“2”（或“S”，意为吸取）吸取液体，再按主干边的阀“3”（或“E”，意为打空）放出液体。

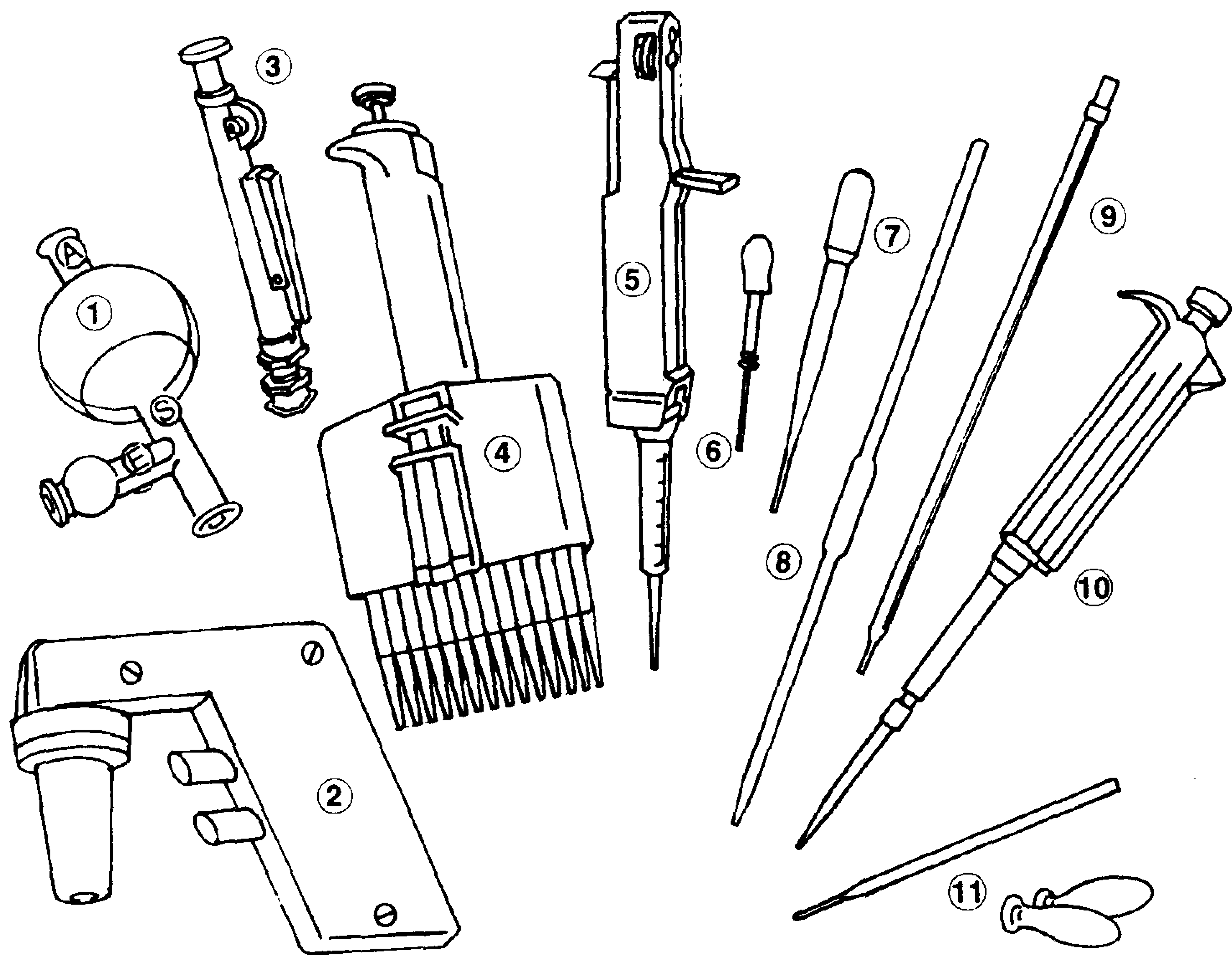


图 3-2　实验台上有几十只移液管、移液器和移液辅助器，这里只展示了其中的一部分

①吸耳球（移液漏斗）；②移液辅助器；③移液泵；④多道移液器；⑤重复移液器；⑥带吸球的毛细移液管；⑦转移移液管；⑧测定体积的移液管；⑨刻度移液管；⑩定体积移液管；⑪巴斯德移液器和吸耳球。

移液辅助器　与 1～100ml 的玻璃或塑料移液管连接使用，控制体积在 0.1～100ml。组织培养用的移液管口的滤器可以保护电子成分和防止交叉感染，与一般电源

和便携充电电源连接使用。

移液泵 手工、安全，通过拇指转动可准确的用单手操作。快速释放移液管的液体，对于不同型号来说，有的用摇杆，有的用快速移动杆。

☆ **建立一个吸气机。**用于移去上清，是大多数实验室的常规用法，应有专门为水、非放射性物质所准备的设备，你可能不得不自己来组装。

你将需要

房间真空器和泵 房间真空器可能更受欢迎，因为不需要维护。

两个 1L 或 2L 的过滤瓶或真空瓶 阻止液体被吸到泵或房间真空器中，两个烧瓶一前一后相连，第二个烧瓶可以防从第一个烧瓶中偶然流出的液体。

真空管 聚乙烯真空管的内径是 1/4 或 5/16 英寸，外径是 1/2 或 9/16 英寸，壁厚是 1/16 或 1/8 英寸。

> 装配一个吸气机的主要部件一般在储存室中都会有储备，如果没有，任何一种材料你都可以在一个大的公司目录中找到。

带孔橡皮塞 橡皮塞至少要露出瓶口 2 cm，这样塞子比较容易拿下来清洗。多数目录上有其尺寸规格表，可购买带孔或不带孔的橡皮塞子，除非你确实想钻孔，否则你就买钻好孔的。

玻璃移液管或玻璃管插到橡皮塞中 应使用厚壁的玻璃管，不要用移液管或巴斯德移液器。移液管太长，因而你不可能将烧瓶装到与短的玻璃棒（6～8 英寸）一样高的水平。巴斯德移液器太短且很脆，在插入塞子时很容易破碎。

0.45μm 滤膜 在生物安全设备建立的过程中，必须阻止生物危害物质被吸入到真空管道中，如果你计划抽滤细胞或细菌，最好在实验台吸气机装置中放上一张滤膜（见第 8 章）。

参见“实验台的维护”寻求更多的建议以及第 9 章介绍的用于移取上清的吸气机的用法。

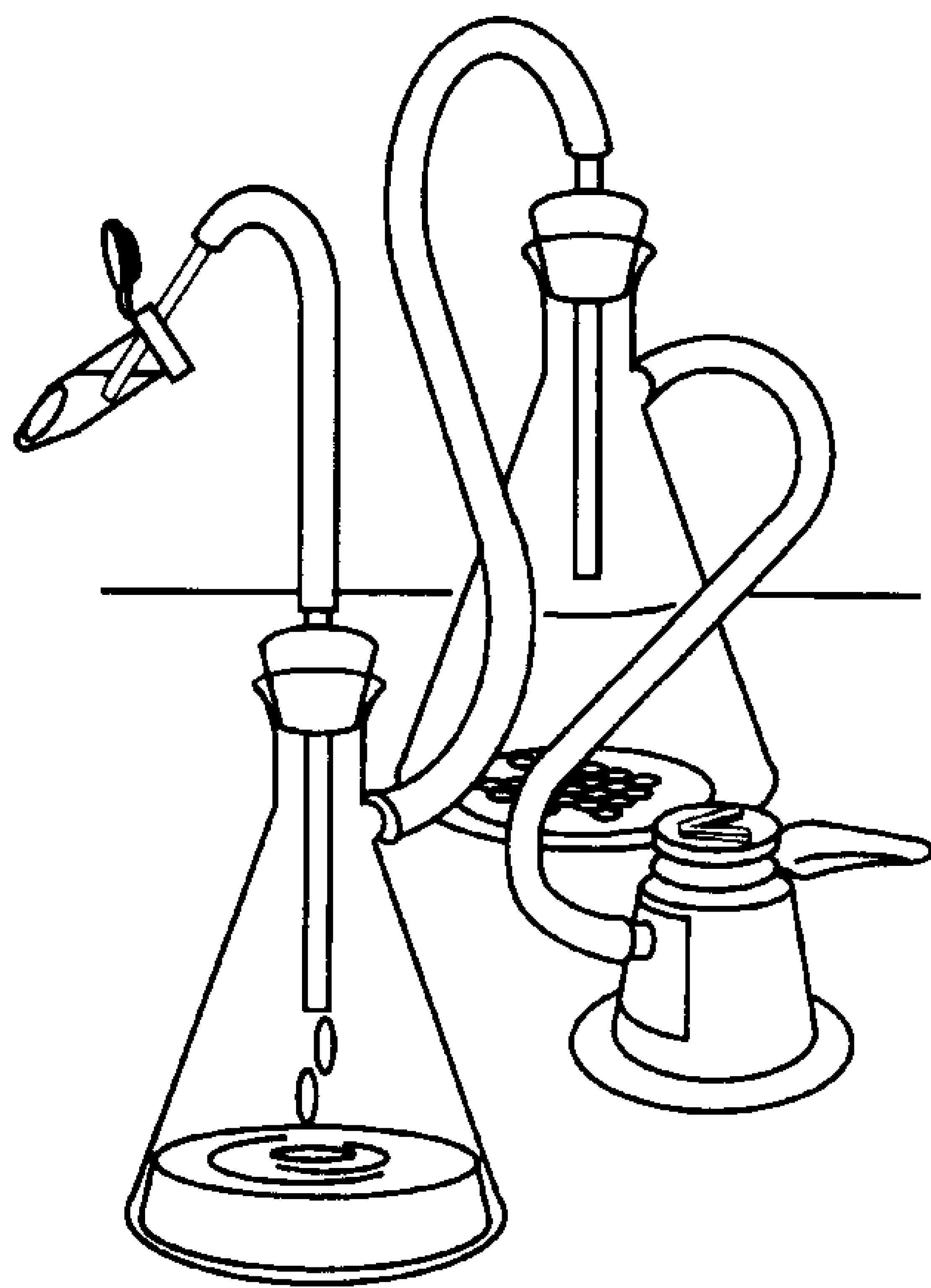


图 3-3 实验台抽气机，与房间真空器管相连

（得到 Sambrook 等许可，1989 年）

☆ **实验台的维护**

日常维护

确信实验台空间完全清洁。

每天实验结束后用温和去污剂或 70％乙醇擦洗实验台，如果台纸浸湿，注意换掉。

倒掉冰桶中的冰并进行冲洗。

每周维护

补充微量离心管和移液头。

倒掉所有生物危害废物。

收纳

按照部门要求，取一个新的尖锐物收纳盒，处理掉旧的盒子。

吸气机 即使不常用也应定期清洗主烧瓶，液体蒸发会留下一些难以清洗的污迹。如果经常使用，最好每天清洗，清洗方法取决于内容物。

- 无危害和非生物物质，如缓冲液，可以倒入排水系统，冲洗摇瓶几次。
- 生物危害液体（也包括大肠杆菌的上清液），处理前必须使其失去感染性。加入大约为烧瓶中液体 1/10 体积的漂白粉，轻轻旋转后静置 30min，在水流动的情况下将其倒入水槽，保持冲水几分钟，注意避免吸入烟雾，冲洗烧瓶几次。
- 溶剂和有害物质，包括酚，必须根据单位安全法则来处理，与 EHS 或实验室的安全员联系。

> 如果你常使用和清洗吸气器具，在替换前加入漂白粉。

生物危害垃圾的处理 生物危害废物常用双层袋装并且仅使用特定袋子。正常垃圾处理前必须经过灭菌，这是个人、实验室或单位的责任。

移液头盒 可以购买灭过菌的移液头，但大批量购买的移液头会更便宜。需要将它们插到移液头盒中，插移液头时要带上手套，防止皮肤上的油脂沾到移液头上，插完后贴上灭菌带，写上日期，高压灭菌 15min。

有些盒子买来时是一个叠在另一个上，像塔一样，取移液头时不要粗鲁地刺盒子，如果碰倒中间的盒子，整个塔就会掉到地上，洒的到处都是。

微型离心管 和移液头盒子一样，微型离心管可以购买灭过菌的，或买来后再放到烧杯和容器中灭菌，灭菌前不要盖上管盖。操作时，在实验台上轻轻摇出容器中的离心管或用镊子来取离心管，不要用未带手套的手摇晃容器。

移液辅助器 虽然有些移液辅助器与电源相连或自身有电池，但大多数必须接到电源上充几小时的电。当你感觉吸取液体不是很有效时，首先检查一下移液管的鼻甲处是否塞了棉花阻断了吸液，如果是就用镊子将它拉出。移液辅助器中的滤膜阻止液体吸入其体内，滤膜可能已经潮湿需要更换，打开鼻甲检查滤膜并及时更换。订购一些滤膜放在你的实验台上，如果没有物理上的障碍，就将移液辅助器插到电源上充电过夜。

移液器 根据使用情况，每几个月到一年必须将移液器校正一次。实验时应该知道移液头中吸取的液体的量，你可能注意到移液体积的改变或者移液器在吸液时空吸的感觉。每几周将新买的和校正过的移液器比较以检测移液器的精确度，有些移液器可以在实验室校正，有些则必须送出去校验。移液器在送出前必须清理干净，不可携带放射性物质。

水浴锅 水浴锅中的水如果已变色或已变味，马上换水。你可以在水中加一些抗菌剂，但这没有必要。水浴锅中只用蒸馏水，为了防止蒸发，可以用盖子或在水面放上乒乓球。

建立一个指挥中心

你需要做的大多数研究将不是在实验台上完成的，而是在办公桌和计算机上完成的，当你组织信息、思考、阅读和分析数据时，你的办公桌不仅仅是你放笔记本和电话号码的地方，而应该是一个避难所或者源泉，一个控制你研究方向的有力场所。

办公桌

在你的实验台旁放上一张办公桌是非常方便的，在阅读时你可以监测实验的进行，还可以在一个干净的地方记录你的实验。办公桌通常很小，为保证办公桌空间的清洁，最好将大多数东西保存在抽屉里和架子上。好的组织能力使你超过其他科学家，那就要从你的办公桌开始。

办公桌上的书架适于存放图书馆参考书、期刊、论文等等，不要在这里放任何化学物品和实验仪器。

其中的一个抽屉应专门用来放置论文和文章，如果没有合适的抽屉，可以找一个小的文件橱放在办公桌的旁边或下边。

另一个抽屉应该有锁。个人物品和敏感的实验数据应保存在里面并上锁。背包、钱夹、支票本等常常会从看起来很安全的实验室消失。

如果要在靠近办公桌的实验台上进行放射性操作，应该在实验台和办公桌之间放置一个塑料隔离屏障或平板。

办公桌必需品

计算器　你可能会在计算机上有计算器功能，但是你需要一个随时可以拿到的计算器，在有些实验室你必须拥有自己的计算器。

日历/备忘本(管理器)　这可能是你个人的秘密，不论选择什么规格，纸质或电子的，你必须有一个空间来记录学术报告会、约会、想法和实验计划。

实验室记录本　笔记本或活页，见第5章。

计算机储存媒介　你必须总是准备好将文档储存到适合你计算机系统的压缩磁盘、钥匙盘（密钥盘)、CD或其他媒介。

纸或笔记本　用于记录实验步骤、冰箱中的冻存物等。

即时贴　对于摘录书及杂志中的内容，或留条，都非常宝贵。

铅笔　用于在显微镜玻片上做标记，因为标记不会被乙醇或甲醇洗掉。

钢笔　手边不要少了钢笔，应用钢笔记录所有数据，不要用铅笔。

尺　透明塑胶制品，用来测量凝胶或者在图表上划线等。

透明胶带　在用记号笔作好标记后，贴上胶带以阻止记号污染成一片，也可用于将数据页粘贴到笔记本上。

公文架　你应该有2～3个公文架来分类放置论文。

办公用纸和其他办公用品

- **办公桌上的所有信息应该在5分钟内找到。**当你想找到上周在某篇论文中看到的一种方法或者你试图为这周或下周一个不应错过的报告会准备数据时，你会发现时间非常宝贵。

  如果不注意，你会很快使办公桌上铺满论文，因为没有及时阅读而最终导致这

些论文过时，然后你要用一个下午的时间来处理他们，虽然你感觉完成了一些任务，实际上你什么都没做。

> 整洁和拖沓都不是论文管理的关键，过量参阅论文也没有效果。危机的真正原因在于决策困难：由于你不能决定论文对你能做些什么，那么真正的解决办法是拿起同一篇论文读上5次后再放下。 (Winston 1983)

研究工作是探索信息，应该保存你的信息，那就是信息化，这样做的惟一方法是：

- **避免让你的手多次地接触同一篇论文。**尽量在拿到时就处理好每一点信息。
- **建立一个档案系统。**你拥有的所有信息应该既容易看见又容易找到，建议一些工具是：

  管理器/指定的本子或计算机文档　一个大本子，在上面你可以记录约会、要做的事情、电话号码和 E-mail 地址、报告会及开会的时间。这个本子相当重要，你应该有这么一个本子，在笔记本或即时贴上记上临时的记录。

> 存放在文件夹中的论文应该是你需要的实验方法的论文，与你项目相关的重要论文以及一些不易搞到的论文。大多数论文很容易在图书馆和网上找到，好的解决方法是在计算机上建立文件管理系统，你可以记录参考文献并在纸上写下目录。

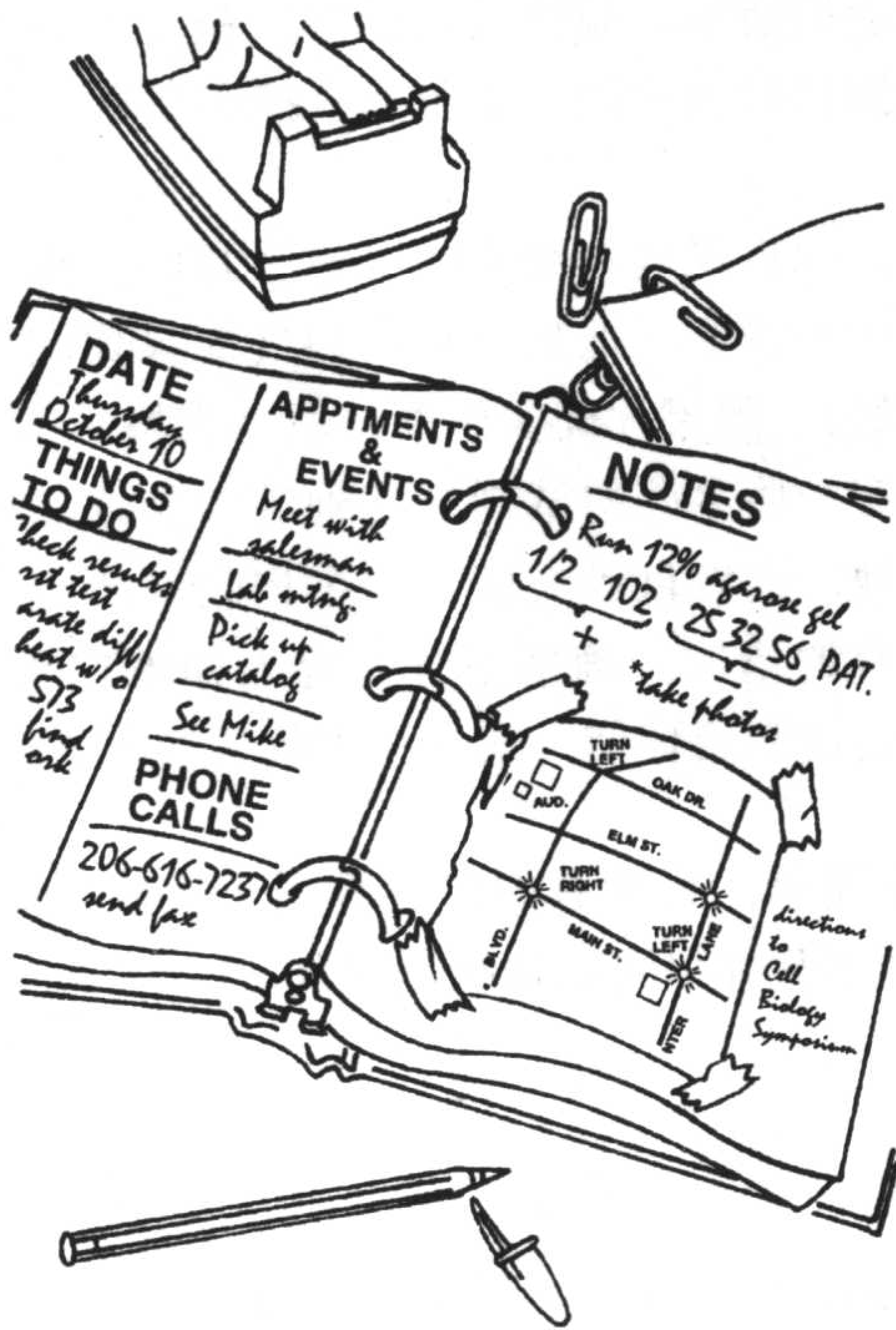


图 3-4　使用管理器和指定的本子记录谈话内容和计划的实验以及科学报告会和研讨会

计算机文档和/或个人数字助理　如果在你的办公桌或实验台附近有自己使用的计算机，你可以建立一个组织或日历文档作为你个人文档系统。个人数字助理是极好的文件备份，可以即时提示你，但通常很难进行快速笔记和作为实验室提示。你的日志和做事清单必须易见或者至少能立即使用。

文件橱　你需要有文件夹来存放期刊文章、私人文件（保险、CV、信件等）、影印文件和数据（底片和活页不适合放在实验本中）。

桌面公文架　两个公文架就够了，一个用于存放刚获得的有待你去处理的论文，另一个用于那些稍后需要处理的论文。也可以按专题分成不同的文件夹，一个要影印的文件夹、一个必须回复的电话文件夹和一个归档前必须阅读的文件夹等。

- 为处理论文和其他要做的事情**建立一个常规的程序**，这属于大日程中的一部分，（你必须把其他任务的时间往后排，以腾出时间重新考虑数据和参考文献，这两部分将在以后的章节中讨论）尽可能安排具体的任务和时间，如每天打开一次邮箱，每周处理一次需要的质粒，每周三阅读文献等。
- 对每条信息你**没有多的选择**，你可以做的是：立刻丢掉、整理文件、采取行动或者同时做以上的事情。有些事情不能立即处理，应该把它归档以待日后处理。如，你可能想将每天得到的科学文献都归在"将读"文档中。确定一个正常的阅读时间，或者确定一个应该阅读的时间界限，别让文件档堆得太多。

文档处理分类法的例子——每日邮件

单位每周学术报告会的清单。阅读这些清单，决定你要参加哪一场报告会，在日历上写上报告主题、演讲者和时间。不要把它挂在那里不予理会或者仅作为参考，要完成它。

新杂志的订阅介绍。你想要这本杂志吗？你会真的阅读吗？你能承担得起费用吗？现在就决定。如果你不想要，把它丢在一边（如果你改变主意，总能找到该杂志的电话号码，这是真的）。如果你确实想要，填写表格后邮出去。

试剂请求。如果仅有一些零碎的试剂，立刻进行处理。如果实验室有人负责这样的事情，礼貌地交给他，或者自己去做。如果你收到的请求很多，将请求集中起来，每两周处理一次所有的请求。确信主管研究人知道你正发送的试剂是给谁的，除非你已有安排否则在送试剂给任何人前，让主管研究人知道。

- **实验永远优先**。原因很简单，将所有的时间都用于实验台的工作，有时最仔细地组织系统也要停止。做好实验并尽可能地控制时间。

使用计算机

实验室电脑不是奢侈品，而是写作、研究和交流不可缺少的工具，至少你要通过电脑进行文字处理和文献搜索。在第一周的工作中，检查电脑的运行状态应占据优先位置。

如果你不知道如何使用电脑或者对应用有疑问，立即与电脑服务部联系，参加电脑方面的培训课程。看起来这是一个额外的时间投资（一天或两天），但它会节省你很多的时间。

文字处理

文字处理软件用于文章组织和操作，即使你喜欢用铅笔，但为了编辑、印刷、传送和投递杂志的要求，这些信息最终必须储存在磁盘上。

现在，文字处理软件有拼写和语法检查、制表和画图等功能，更重要的是这些程序能够与参考目录、电子制表软件、数据库软件一起使用，来自其他应用方面的信息也可以整合到手稿和相应的陈述中。

> 如果电脑入门是一件可怕的问题，可以先在纸上写出来，但是你使用键盘越多，节省的时间也就越多。

核查实验室单位使用的处理程序，运用该程序，不要使用你的老程序，如果你在基金申请或手稿上需要秘书的帮助，你最好采用他们习惯使用的程序。大多数程序是相同的，不要多少时间你就可以很快地掌握一种新的程序。

> 你必须确信你的程序能工作，一个方式就是使用来自同一制造商的一套相关软件。

参考目录的管理

尤其在你进实验室的早期，已阅读的和想要阅读的论文会很快积累。一个参考目录管理程序会帮助你通过记录和组织相关的参考书来控制这些文件。可以通过关键词、作者或期刊重新找到参考书，使得寻找到特别的论文或关于某一特别主题的参考书目清单变得更为容易，这也意味着你不需要保存许多的论文，因为你可以进入参考书的摘要和笔记部分。

> 你必须确信参考目录管理程序能与你的文字处理程序兼容，虽然你能手工输入所有的参考书，但能拥有与先进的参考程序及和你用的所有图书馆搜索程序兼容的文献管理程序是一件非常棒的事情。

参考文献清单可以按任何杂志风格格式化，如果你为另外一份杂志重做论文，重新格式化参考文献仅需敲几下键盘。

来自 PubMed、Medline 和其他网站的参考文献，以及兼容的文献更新程序可以直接下载到参考目录程序中。当然，你还可以手动输入参考文献。

进入因特网

从你单位的计算机中心找到如何上网，可能需要你填个表格，还需要你申请一个密码，找出如何在家里进入网络。

电子邮箱能使你与全世界同行相互联系。你可以给合作者发送初稿，浏览和发送数据到其他实验室，你也可以向你的母亲问好。除了你的上线账号你还需要一个邮箱密码和账号。如果你与其他实验室成员共享电脑，确信你有自己的邮箱密码可以直接进入。

期刊可以在网上（在线）查找，由于空间限制，越来越多的期刊需要在线搜寻。查出你的实验室、系或单位可以阅读哪些杂志，并询问如何可以访问。如果你或你的单位没有订阅该杂志，你可以付费获得许多文章的 PDF 格式文件。许多杂志网站只显示目录，有时也提供给未付费者浏览摘要，但这对于阅读非常糟糕。许多杂志乐意提供给你每期新出杂志的 eTOCs 年杂志目录的电子邮件通知。

通过图书馆现行目录进行手动浏览也是一种选择，多数文献检索还是要通过网络在线进行，大多数要通过 PubMed 进行。

新闻组允许你提技术方面的问题、阅读解答并参与在线主题的讨论。如果你想获得关于最好的电穿孔仪的情况，或者获得某一特定实验程序的建议，则可以向合适的群体发出问题。你可以通过网页关键词搜索，找到许多讨论组的清单，或者通过在本章结尾所列几个网站的某一个找到它们。Listserv 站点允许你粘贴问题，但是问题和答案都通过电子邮件传送。

技术文献在多数公司的网址中都能够获得。这些信息不仅仅涉及该公司的产品，还会与基础研究相关。

关于 PubMed

PubMed 是国家医学图书馆（NLM）数据库，包含了数百万篇自 20 世纪 50 年代以来的文献。数据库由 NLM 的国家生物技术信息中心（NCBI）创建，位于美国卫生研究所（NIH），免费访问。

联机医学文献分析和检索系统（Medline）是使用的主要数据库，查阅服务通常被称为 Medline/PubMed。

Entrez PubMed 是一种针对所有主要数据库的文本依赖的搜索和修复系统，主页提供了一个指南，告诉你如何进行最好的搜索。

医学主题标题（MeSH）是 NLM 控制的词汇辞典，被用于索引 Medline 主要刊物的文章，还提供搜索文章可选择的途径，例如在 MeSH，关键词抗坏血酸的检索还会同时涉及关键词维生素 C 的搜索。

Loansome Doc 是通过 PubMed 和 NLM 网上订购文章的一种方法，这需要与当地健康服务图书馆联系。

连接 PubMed 到 NLM，网络系统可允许使用者同时在美国国家医学图书馆的多元恢复系统搜索。

对于很多问题的答案，无论是技术的还是非技术的，可以通过快速的 Google 搜索（使用 Google 搜索引擎）搜索问题中的单词或词汇。

数据收集和整理

你可以将数据输入电子制表软件（为计算）或数据库（为整理和再搜索）。许多仪器，如扫描仪、显微镜、β-计数器和部分收集仪都是直接与有相关程序的电脑相连接，电脑程序可以收集和分析数据。在这种情况下，你的文字处理程序的兼容性可能不是优先考虑的因素，甚至可以不考虑这些因素。然而，许多程序是标准的，可以与你的其他程序相互协调。

图表

复杂的制图表软件，允许你输入数据制成不同的图表和表格。数据很容易添加或清除，图表也可以重画。简单的图表可以通过文字处理、电子制表和数据库软件制作，也

可用绘画和演示程序。

演示程序

演示程序对于学术报告会上制作幻灯片有用，但对于出版物的图示却不是很有效。文本、图和表格能够以艺术性的形式表现出来，可以作为幻灯片在电脑上演示、打印（或稍后印照片），或者通过拍照或合适的电脑软件直接制作幻灯片。

特别软件

有些软件程序用于执行各种数学和理论功能，如设计 PCR 引物（见 12 章）或模拟蛋白质结构等等。除非实验室已有运行程序或你对此程序非常熟悉，否则现在不要投入巨大精力来学习新的程序。

组织和安排

仅仅当你接触电脑没有什么限制时，你应该考虑使用个人管理器。一个管理器和日历会记录并提醒你学术讨论会何时开始或细胞该何时收获，也可以为你记录电话号码并为你拨号，但是你必须为此一直使用计算机程序。

> 你应该只运用一种组织管理系统，同时运用电脑程序和指定的本子记录日常事务几乎不可能。

扫描仪和扫描软件

图片、文本、数据和文件可以被扫描到你的电脑中，然后将扫描的图片存入你的电脑程序中。你可以对这些图片进行操作，也可以通过因特网电子邮件系统传给其他研究者。如凝胶可以被扫描，画图或演示软件可以用于标记每一泳道或制作幻灯片。

计算机使用的基本规则

- **核实你能用哪台电脑。**人们对他们的电脑有很强的占有欲，看见有人在没有被允许的情况下将可能隐藏有病毒的磁盘装到电脑中会使他们极为恼火。如果实验室没有足够的电脑，那么看看系里是否有电脑可用，也可以询问单位的电脑中心。
- **如果明显发现某人正在使用之中，你一定不要去用。**如果他们没有保存工作文件，你可能会使他们的全部工作结果丢失。
- **在离开电脑前你应从你正在工作的程序中退出来。**这会给别人一个清晰的信号，即这台电脑是可用的。同时还减少了别人阅读你的私人文件或彻底丢失你的数据，或打开太多的程序而使计算机瘫痪的可能。
- **保存、保存、保存。**在两个地方保存，可保存到磁盘和硬盘上。如果你保存在共享硬盘上，确信你建立了自己的文档（如…/你的名字/手稿 3）。如果你的文件非常重要，最好把它存在磁盘、CD 或移动硬盘中。
- **检查所有下载的软件和数据、磁盘是否携带病毒。**电脑应该有一个病毒检查程序（如果没有，你应该通过电脑服务部装上一个），这个程序能够检查电脑启动，也可

检查所有放入的磁盘和所有下载的信息。下载时先存在临时目录，检查病毒后再将信息传到你想传送的地方。

- **关电脑前退出所有的程序。**晚上电脑应该关机，尽管有些实验室认为电脑常开着也没有什么坏处。
- **打开显示器前先打开主机，关机前先关掉显示器。**
- **有人需要用电脑时不要玩游戏和登陆无关网站。**工作永远优先。
- **在电脑打开和进入程序前不要把软盘插到电脑中。**电脑会试图从软盘的某些系统中登陆，通常没什么大碍，只是时间上有些耽搁而已。
- **不要从电脑上抹掉或删除任何东西，除非是你自己的文件或数据。**如果硬盘空间被占满，告诉所有人删掉不必要的文件或复制到另外一个路径，不要删除未经别人检查或是未给予足够预先警告的材料。
- **进入因特网必须有密码，申请一个且不要给任何人**（通过系办公室程序核实）。有些程序和电脑也需要密码，这些不应该与你的上网号相同。
- **在电脑前工作时不要吃东西。**这会使键盘发黏，不要忘记实验室不准进食和喝饮料。
- **不要将你的磁盘或电脑暴露在磁场中。**如大功率音响产生的磁场。磁盘上的信息通过磁性来储存，太接近磁场会抹掉磁盘上的内容。

如果你将饮料洒到键盘上，应立即关掉电脑并拔下键盘。尽可能擦掉饮料并在你插回键盘前隔夜晾干。

在慌张无措前

如果计算机反复死机或者似乎要崩溃，立即将你的工作保存到软盘或 CD 中。

如果计算机不能开机，检查电线，确信有电源。

（赵迎春　王维荣　黄伟达）

参考文献

BioSupplyNet. http://www.biosupplynet.com

This web site is a comprehensive directory of biomedical research supplies and equipment.

BioTechniques Home Page

http://www.biotechniques.com

A library of techniques, a buyer's guide, and connections to many biological research sites.

National Institutes of Health (NIH)

http://www.nih.gov/science/journals/

Pointers to on-line journals are available through many web sites. A comprehensive list can be found through the NIH site.

PubMed Central. The U.S. National Library of Medicine's digital archive of life sciences journal literature. Access is free and unrestricted.
http://www.pubmedcentral.nih.gov/

PubMed Tutorial. A web-based learning program for maximizing searches and uses of PubMed.
http://www.nlm.nih.gov/bsd/pubmed_tutorial/m1001.html

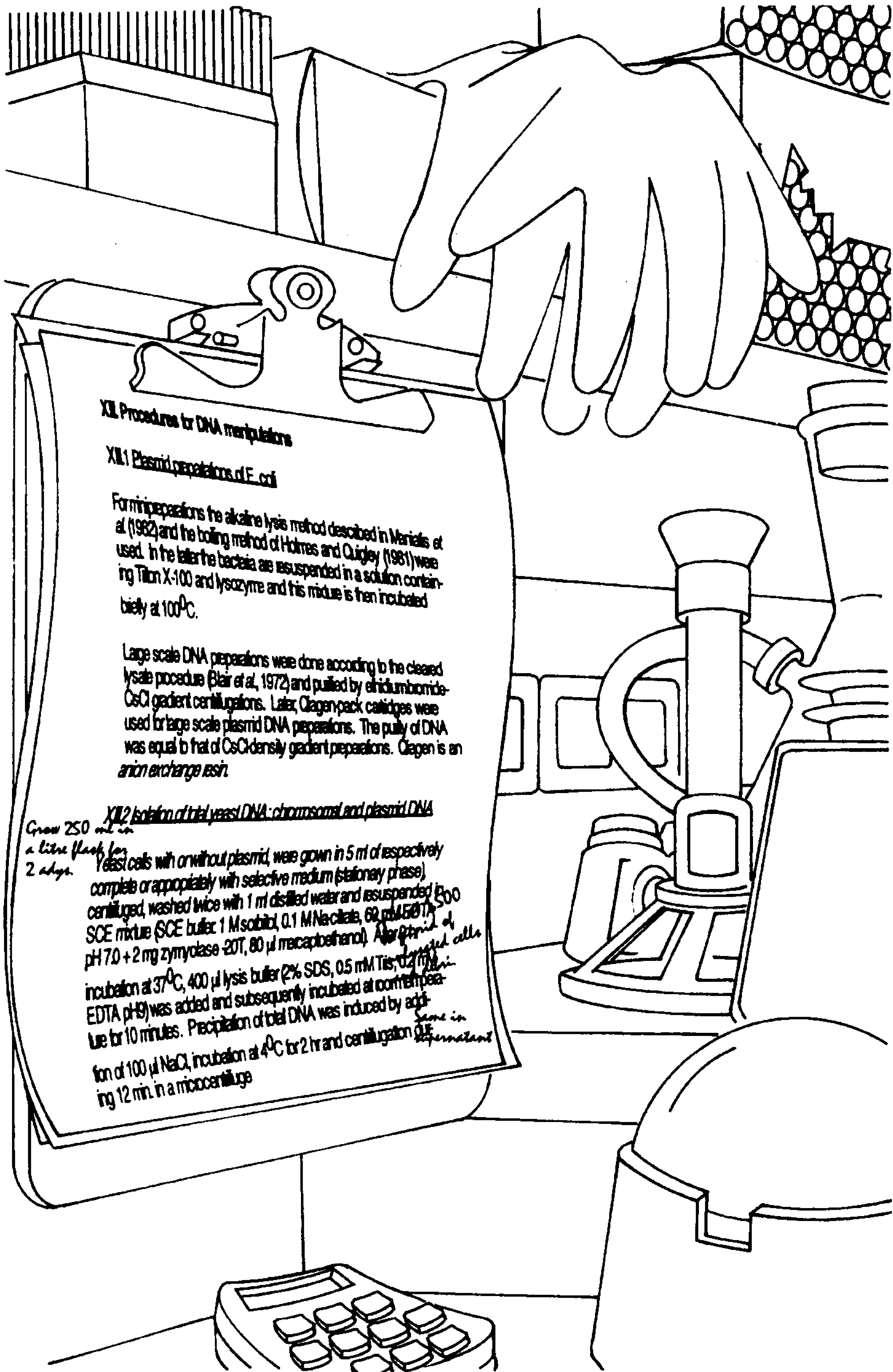
Sambrook J. and Russell D. 2001. *Molecular cloning. A laboratory manual,* 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sambrook J., Fritsch E.F., and Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual,* 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

United States National Library of Medicine (NLM). In addition to access to PubMed and Medline, information on research, grants, and training is available.
http://www.nlm.nih.gov

Winston S. 1983. *The organized executive. New ways to manage time, paper, and people.* Warner Books, New York.

第二篇　策划实验教程


XII. Procedures for DNA manipulations
XII.1 Plasmid preparations of E. coli
For minipreparations the alkaline lysis method described in Maniatis et
al. (1982) and the boiling method of Holmes and Quigley (1981) were
used. In the latter the bacteria are resuspended in a solution contain-
ing Triton X-100 and lysozyme and this mixture is then incubated
briefly at 100⁰C.
Large scale DNA preparations were done according to the cleared
lysate procedure (Blair et al., 1972) and purified by ethidiumbromide-
CsCl gradient centrifugations. Later, Qiagen-pack cartridges were
used for large scale plasmid DNA preparations. The purity of DNA
was equal to that of CsCl-density gradient preparations. Qiagen is an
anion exchange resin.
XII.2 Isolation of total yeast DNA: chromosomal and plasmid DNA
Grow 250 ml in a litre flask for 2 days.
Yeast cells with or without plasmid, were grown in 5 ml of respectively
complete or appropriately with selective medium (stationary phase),
centrifuged, washed twice with 1 ml distilled water and resuspended in
SCE mixture (SCE buffer: 1 M sorbitol, 0.1 M Na-citrate, 60 mM EDTA
pH 7.0 + 2 mg zymolyase -20T, 80 µl mercaptoethanol). After
incubation at 37⁰C, 400 µl lysis buffer (2% SDS, 0.5 mM Tris, 0.2 M
EDTA pH9) was added and subsequently incubated at room tempera-
ture for 10 minutes. Precipitation of total DNA was induced by addi-
tion of 100 µl NaCl, incubation at 4⁰C for 2 hr and centrifugation dur-
ing 12 min. in a microcentrifuge

第 4 章　如何建立实验

实验是用于验证一个假说有效性的一种测试过程，实验是你为什么在实验室工作的根本原因。如果一开始不仔细，你很快就会陷入因草率实验而形成的泥淖中，得到一些不清晰的结果，最后只有离开实验室。

对于组织和清晰思路有一个极重要的建议忠告，**在实验室的第一周就开始做实验**，不要等到你认为你“知道得更多了”才开始。计划实验与参加一个组织非常相像——除非你有经验才能参加，而只有成为其中一员你才能有经验。你可能已阅读了每一篇相关的论文、记住了实验的程序、与实验室的每个成员进行了交流，但你仍不能真正理解你将要做的新实验。**先做实验**，在做完第一次实验后，所有的东西——理论、技术、含义——将会变得极为清晰。自己阅读和准备实验，直到确实做完，你才会对自己的项目有全面的了解。

并不是所有的实验都会让人胆战心惊，只想做很兴奋和新鲜的实验是件可怕的事，要确信你的实验可以重复、可以信赖和有整体性。

综 合 考 虑

- **在脑海中确立实验的重要性**。你一旦开始工作就不会有很多机会去有意识地全面关注你实验的相关资料，但是当你确定实验后，重要的是要记住你在做什么实验和为什么在做。科学地思考！有时候实验室的工作看起来可能很乏味，记住为什么你已经第 10 次重复相同的实验还能继续下去，在头脑中保持一个大的框架能帮助你在方法上维持整体性。
- **记住你必须发表你的实验结果**。发表论文是重要的——没有它你就不能生存。如果你认为每个实验都是可以独立的和可发表的实体，你可能更会记住所有必要的对照和变量。将每个实验作为可能发表的内容来考虑，会让你的精力集中在实验上。转移到其他的领域很容易，其中部分的研究是新领域研究的一部分，但是探索必须严格地进行，而不是疏忽职责。
- **将自己训练成一个彻底的仔细的研究人**。你会建立你的声誉，不仅仅是通过实验结果，还有你建立实验的方式。有些人被誉为优秀的“实验台”科学家，这意味着他们对实验考虑得很充分，操作执行得很好。尽早建立你的声誉，你获得的即使是非正统的数据，人们也容易相信。如果你实验台的同伴信任你的数据，实验室的领导可能更相信，从这点看，这是科学家交流的便利之处。信任度是关键。

> “……科学家非常看中实验研究人员的声誉（如仔细、勤奋工作），就像关注其实验细节一样，他们通过这些来估计数据组成的可靠性。”（获得美国科学家、Sigma Xi 杂志、科学研究协会等的允许，来自 Woodward 和 Goodstein，1996）

- **做一个有评判力的思考者。** 对于大多数科学来说，隐藏在实验后面的理论不是一成不变的，有很多方式可以解释怎样或为什么这样做。

解决问题和实验的方法

缩减法　将一个问题分成几个部分，分开解决每一个部分。

推论法　提出一个假设并收集数据，证实或否定假设。

归纳法　检查不带任何偏见收集起来的数据，提出一个假设来解释所有观察到的事实。

反证法　由 Karl Popper 提出。如果从某假说得出的结论证明是错误的，那么由此得出的也为伪论，应该拒绝。

单独看的话每个方法都是不充分的，应该综合所有的方法。为了找出思维和实验方法上的漏洞，你应该从不同的角度全面衡量数据，不要把你的结果向你期望的结论上倾斜。

“我经常会有这种感觉，我的手比我的脑子更聪明，这是一个辩证分析实验的原始方法。当进行顺利时，就像真正地在与自然对话，一个人问一个问题，随后获得答案，另一个人问另一个问题，得出另一个答案。实验是使自然理智说话的工具，之后人们所做的就是认真倾听”。（George Wald 允许，1968，美国高级科学学会）

计划实验

1. 定义问题

每个实验应该通过回答一两个特殊的问题来提出一种假设，仔细思考和阅读，同时与其他的科学家讨论，能够帮助你定义问题并设定实验的参数，确信不要提出那些不能回答的问题。

2. 设计实验

- 实验变量　你希望看到什么？如，你要看到时间或浓度的影响，或者是看到两者的影响？你会用什么浓度？又应该取什么时间点？
- 对照　每种实验变量都需要一个对照来显示所获得的结果是处理的结果。
- 样本数　你应该重复样本两次、三次、还是多次？对于任何生物学活性测量来说至少需要重复两次。

做小实验。 从每个实验获得尽可能多的数据是非常有诱惑力的，理论上说可以节省时间和资金。细胞需要时间生长，试剂需要保存，而时间是最大化的，**但是对于小实验来说，回报/投入比确实要更高。** 操作大实验需要许多的专业知识，还需要一些运气，在许多小实验完成之前，不要有这种冲动。

决定什么是大实验，什么是小实验完全是主观的，但是一般来说，**如果有许多试管让你感觉混淆不清，你的实验就是太大了。** 如果你觉得这种情况发生了，将实验分成两个部分，先做第一部分。

最后，你不会因为你成功地完成了一项大实验而收获到什么，你可能收获得是在发表的论文上有一幅可爱的图表，但这只会在长期的实验积累中获得，不要意气用事。

- 统计　统计分析是必须的，它能帮助你确定样本的大小和指导实验其他方面的设计，考察一下你是否需要将自己的数据进行统计分析——到实验结尾时就太晚了。

在建立实验之前不好好思考，既浪费时间又浪费试剂。许多初学者（还有季节性实验者）为了获得有意义的结果而做很多的实验，自己可能感觉很忙碌而且意义重大。别犯傻了，仔细设计实验是没有替代品的。

3. 建立实验

- 获得和准备一个实验操作程序。
- 准备试剂、登记所用仪器、培养细胞，确信你准备好了实验所需各种成分。
- 在脑海中预演一下，确信不要忘了任何东西。
- 如果是较为复杂的实验，要用很贵的试剂，可省略试剂预演一次，这可确保计划的实际操作的灵活性。
- 观察别人做实验，如果你要使用新的技术，请问做过相同实验的人员，看看是否可以观察他做实验，或者让他帮助你。

4. 做实验

确保你有足够的时间做实验，在你估计的时间上再加上一个小时，实验过程中记录下结果和观察到的现象。

在计划或操作复杂实验时不要交谈，别担心要求别人不跟你说话。有些人会戴上特定的帽子或个人听放器（有或者没有磁带的）来暗示同伴他们需要集中精力。

5. 收集和分析数据

在进行下个实验前，尽可能快地检查数据，不要让未读的幻灯片或图片随时间积累。不论结果是好是坏，与实验室其他研究领域的科学家讨论问题是一段快乐的时光。

设计实验时犯的常识性的错误

- 没有考虑实验的必需品；
- 计划大而草率的实验，企图解决生物学领域的所有问题；
- 忘记评估前面做过的实验；
- 没有考虑对照以确保实验的可解释性；
- 实验前没有检查以确保所有试剂是否准备好。

6. 重复实验

实验结果应该可以重复，否则毫无意义。最终它必须能被别人重复，因此你必须确认你的实验是可靠的。

研究背景

许多实验设计中的错误可以通过了解专业领域来避免，即使你有实验操作程序，仍需要了解细节和实验原理。通过查阅文献你能发现常用的技术，可能期望的结果，最可能使用哪种试剂，用什么浓度，还有无数可以在你无望时给你提供帮助的细节。

从你研究主题的一些经典论文开始　浏览这些论文中运用到的参考文献，可能你应该

阅读一下其中大部分，特别是在论文中重复出现的，你应该到图书馆去看看。

对你来说，给该领域的一位专家致电或致信寻求帮助是一个非常好的捷径。当然，你别问一些你自己能(或应该)查找到答案的问题来浪费别人的时间(例如，不要打电话问别人哺乳动物核糖体RNA的大小)，但若你对实验有特别的疑问，你可以致电。

对PubMed进行关键词搜索 不仅要查阅现行的论文，还要查阅老的论文。在无尽的杂志中有许多好实验被埋没，因而它们的价值没有被发现。运用你的判断力对大量论文中出现的数据作出评估，评估数据时不要受声誉或杂志名称的影响。

通过阅读现行文献保持对你研究领域的了解 大多数人有规律地阅读有关专业主要发展方向的一些期刊，但实验的点子和技术常会在一些你实验室没有专门期刊和其他刊物中出现。因此你应该系统地搜索现行的文献，安排一个有规律的时间搜索PubMed，通过关键词和作者名来搜索。或者运用文献搜索更新程序并保证每周向你传送一次近期杂志。

对照

理论上说，对照应该显示你不做任何处理时将发生的一切，因此它能显示你实验结果的真正含义。*实验中对于每个变量都应该设定对照*，实验中对照多于样品的情况并不多见。对照没有附加条件，更不是浪费时间，完全是每个实验解释整体的一部分。

对照不是只做一次，每个实验都必须重复。这包括酶活测定反应的标准曲线和凝胶电泳的标准分子质量，假定这些对照是相同的，回到早期的实验和运用那些对照的数据是完全没有价值的。

对照的类型

实验对照。这些对照告诉你基本实验程序是否正确进行。实验对照的例子包括，用于DNA、RNA及蛋白质凝胶电泳的标准分子质量（也被用于测定分子质量）。从标准分子质量来看，它能判断凝胶是否是设定的琼脂糖或丙烯酰胺的浓度、凝胶到滤膜的转移是否完全、电泳是否有效。

处理对照。处理对照包括正对照和负对照，可以显示细胞的实验处理是否能产生结果。如果你通过多个因子作用于样品上，单个因子的影响必须要有对照。因此，如果你想观察X因子和Y因子对培养的作用，你必须单独在X或Y因子存在的条件下做对照。

正对照。正对照通常是实验对照，它可以显示如果处理发生作用数据应该如何。正对照的例子有：当用荧光标记细胞转染X受体时，细胞表达X受体的增加量；已知细胞对X因子刺激后生长的影响和检测X因子对未测试过的细胞的作用。

负对照。负对照显示非处理操作对你读数的影响。负对照的例子有：当用免疫荧光标记细胞转染X受体时，细胞系表达X受体的量没有增加，且对未检测过的细胞进行X因子效果测量时，通过刺激不会使细胞对X因子产生应答。

负对照常被忽略，如果不考虑它，也不会有什么妨碍。在第一次建立系统和设计实验时，区分正效应和高背景相当重要。起始时，正效应结果出现，实验能以相同的有效

结果出现，许多希望都被延续——然而有时候不管合适不合适，会有负对照在所有条件下都出现的情况。

时间点。对于实验过程中的每个变量都应该有一个时间对照。如果用 X 因子处理后，观察 mRNA 在 0、5、15 和 30 分钟时的半衰期，你必须有一个对照显示在没有 X 因子的作用时 0、5、15 和 30 分钟的细胞培养情况，不要只想取 0 和 30 分钟时的情况了事。每个实验都需要对照。

设立时间点是为了一个样品的收获完全在另一个样品收获之前进行，如果样品收集发生阻塞，找一个“静止点”来收集，如可以将细胞放在冰上直到实验结束。但是你对一个样品所做的实验必须在其他样品上重复，如你将一组样品放在冰上静置 5 分钟，也应该对所有的样品进行同样的处理。

零时间对照。你应该在处理后尽可能地立刻快速收集样品。是的，许多情况下，零时间即意味着延迟几秒或几分钟，但是你必须尽可能的靠近取样时刻。

为了做零时间点，应该在一个非常早的时间点后进行，除非与样品的时间没有关系。如果你想在加入 X 因子后收集 0、5、15 和 30 分钟时的细胞，那么先在样品 5、10 和 30 分钟时加上 X 因子，并把他们放在一旁培养，然后在 0 分钟样品中加入 X 因子并立即停止反应或收集样品。

如果没有足够的样品，你应该去除哪些对照？

尽管作了最好的计划，还是会发生这种事情：某些液体滴下或样品被污染。这可能不完全是操作原因，可能是你被叫离实验室而不能在所有时间点收集样品，但仍要尽可能多的收集有价值和需要的数据。

你省略的对照可能是最重要的，但省略了程序对照和副本实验对照仍在控制之中。

如果你必须省略更多的对照，就不值得再将实验做下去了。没有对照的实验是没有价值的。

统计学

为了让人信服，你需要对数据进行统计分析吗？在生物学研究中，这不是直接的问题。有些领域的研究很有必要运用统计分析，但是有些领域认为对于效果相当明显的数据没有必要进行统计分析。一般来说，你的实验室可能对产生的数据作些统计，但也可能不做。

你应该决定是否对数据进行分析，这可能是一个显而易见的决定，尤其在你进行统计训练时。看看实验室其他人和该领域的论文，观察他们的数据是如何处理的，带上这些论文和你的实验计划书与单位（也可能是电脑中心）的统计学家谈谈。与其中的一个统计软件销售公司联系或在网上查询和访问，也可在相关的新闻组中粘贴问题，请求指导。

了解公式对于样本和总数有所差异，这就是为什么你不能简单地打开一本书拿出一个公式来运用的原因，除非你知道你在做什么。没有统计要比错误的统计还要好得多。

大多数工作可能是试图建立一种概念，即你的数据是实验操作的还是随机的结果，数据是否与假设一致，你可能想基于总体信息对样品的特征做一些预测，或者基于样品的信息对总体特征作预测。

生物医学实验室统计运用的例子

- 根据样本的信息估计总体的特征：学生的 t 检验能够使你充分了解分配总体中平均的、小的或正常的情况，然后你可以从表格中得出一种结论。
- 根据总体的信息预测样本的特征，运用正常的分布曲线，找出可能出现的概率。

> P 值或概率，测试从假说观察到的情况是否随机出现，如果 P 值非常小说明假说可能是真实的。

- 看看处理前和处理后两组观察值之间的差异，是否能用随机原理解释。对于大样本（超过 30 个），运用不同的方法进行检测，对于小规模的样品，可用 t 检验检测。

> **标准偏差**是测量平均值对单个测量值的误差进行检测。**标准误差**（也即大家熟知的平均标准偏差），通过从理论数据库平均值的测量来观察所有数据的平均值，是检测理论平均值与实际平均值之间有多接近的一种方式（Koch，1994）。标准偏差和标准误差有时被相互转换（是错误的），一般人会选择标准误差，因为它为一个更小的值并明显最小化数据的分布。
>
> 基于多个样本，运用标准偏差可以显示特殊数据如何再次产生。

- 运用卡方测验测定在给定总体中抽出样品的概率，可以用 ANOVA 或 t 检验。
- 运用线性回归方程，预测与某个测量样品相关的结果，如果两个测量值有线性关系，你可以计算相关系数，实验室中计算双倍时间是最常用的线性回归方法。

> 确信数据是线性的。其他的模型，比如二次方程式或指数等可用于计算。不存在线性关系时，假定的线性化常常会给出错误的数字。

- 做一个变量分析（ANOVA），同时从多个样本考虑数据并分析每个样本随机变量的系统差异，如果你想看看用一种方法进行两次实验操作处理的结果，可以做一个二维 ANOVA。
- 当 X 因子被加到一个实验组中，而 Y 因子被加到另一个实验组中，运用无效的假说来决定概率，看看两个实验组之间的差异。对于大的样本可用 z 检验，小样本可以用 t 检验。

> 如果你期望从总体得出一个很有力的结果，最好不要用太多的统计测试（如 ANOVA 和 t 检验），大多数实验会对未知总体作出一个正常分析。

多数计算机电子制表程序能够进行以上的统计处理（Koosis，1997），统计程序也可以做这些工作并帮助你决定统计是否合适。

> 无效假说是一种假定实验结果是随机的假说。如果获得样品数的概率比预先设定的小，百分比更低，那么结果会很显著，无效假说也被放弃。

使用实验程序

1. 从以下地方获得实验程序。

- *另一个研究者* 获得实验程序的最好的地方就是实验室中另一个研究者，尤其是当你第一次做实验时。这个实验程序应该是为实验室的资源和技能专门订做的，可能包涵含有实验操作离心管的重要细节和获得标准溶液的技巧，因而，这会让你觉得有一个专家在边上指导你。

> **每个实验，不管如何操作，必须要有实验程序。** 不管是第一次运用一种技术，还是重复一项普通的操作程序，你应该根据一个书面的实验步骤来进行。即使你做了50次的实验，仍旧要有一个实验程序和实验程序参考书（比如实验步骤3所介绍的）。

- *实验程序手册* 有许多商业化的实验指南能够方便获得，其中给出了许多生物学领域既简单又清晰的实验过程。当然，自己实验室和系实验室的实验手册也是一个简单的实验程序来源。使用商业实验手册的不利之处在于你必须根据实际需要对实验操作程序进行微调。
- *已发表论文的"方法"部分* 这也是找到实验程序的一个不太可靠的地方，方法部分可能出于空间和其他考虑漏掉重要的细节因而声名狼藉。

2. 阅读实验步骤看看是否对你有意义。 假设你在做实验，找一找资料中的操作在逻辑和功能上明显缺乏的步骤。多数实验步骤中有许多的约定，但这对你来说可能不太明显，如"酚抽提"常指用缓冲液饱和过且调过 pH 值的酚来抽提，接着用酚:氯仿:异戊醇再抽提两次。

> 如果你对论文上的实验步骤有疑问，立即打电话给论文的作者，相关人员的地址、电话或电子邮箱地址应该放在文章的首页或末页，发送电子邮件，在没有电邮回复时打电话是比较受欢迎的交流方式。

3. 根据实验需要修改实验步骤并重新写一份。 这只是指那些对于你来说难以理解的或根据需要改变特殊仪器的步骤，如果实验步骤上说要用13 000g离心，你必须找到合适的离心机并在实验步骤上作好记录。

4. 准备好所有列在实验步骤中的试剂并确信你已拥有需要的一切。 所有的物品！没有什么东西是很明显的，如果发现某人正准备使用一个小时的离心机，就会使你的实验计划停下来。你最好接着别人的实验做或者预定使用离心机。第一次实验预定会很冒险，因为很难准确确定你所需要的时间，因此做一个候补计划可能安全点，尤其是你确信需要放射性的元素做实验时，更要在实验的前几周预定。

> 你要用试剂盒吗？如果价格不高、试剂集中、说明清晰，那么大多数情况下你可以使用。但是有一个重要的条件，不要让试剂盒代替你思考，了解试剂盒的每种成分，确信你了解试剂盒的作用机制。

5. 第一次做实验应该严格按实验步骤操作。 为什么呢？如果有人给你一个实验步骤，而你不严格执行，这个

人就不能（或许是不想）帮你解释数据。在你开始改变条件之前，你必须能重复出正常的结果。你必须知道你正在检验的是变量作用的结果，而不是你的技术，在你的实验操作过程中，不要使你成为一个变量。

6. **根据你的经验改进实验步骤。**当你经历实验后，记录下所有对实验操作有意义的改进方法。当你分析数据时，重新考虑其可能性并与实验室其他人员探讨。通常经过多次实验的改进，你会拥有修改多次的打印的实验步骤。修改、扫描、甚至将所有的实验步骤输入到你自己的电脑文件中是非常有价值的。实验步骤的电子化越早越好，因为当实验步骤继续发展时，你可以添加可变的内容并拥有一个清晰的实验步骤。

> 如果你没有立即成功，不要担心。实验室里的人都知道这一点，第一次做新实验往往不能成功，你仔细地重复实验，仍然可能不成功，有可能多次重复。但是在某一次实验中，尽管你确信仍是以相同步骤进行，但实验就成功了。从此每次实验总能成功。

程序案例

实验步骤 1　一份实验操作程序可以用于临时记录实验的特别点和你对程序进行的任何改变。

6-12-02

ELECTROPORATION OF M. SMEGMATIS

B.Jacobs,Meth.Enzymol:204,527,1991

1. Inoculate 1 liter M-ADC-TW broth and incubate approximately 48 h until A_{600} reaches 0.5-1.0.

2. Harvest in 250 ml bottles by spinning for 10 minutes at 10,000 rpm at 4°C.

3. Resuspend each pellet in 250 ml of 10% glycerol and spin as above.

4. Resuspend each pellet in 10 ml cold 10% glycerol, pool into 2 50 ml polypropylene conical tubes, and raise volume to 50 ml with 10% glycerol. Centrifuge for 10 min at 2000 at 4°C.

5. Repeat the wash in step 4.

6. Resuspend each pellet to a final volume of 1 ml in 10% glycerol.*

7. Place DNA (5 pg-5 ug in 5 ul maximum volume; be sure DNA has been washed with 70% ethanol) and 50 ul of cells in an Eppendorf tube and mix by pipetting up and down. Hold on ice 1 min.

8. Set the voltage of the pulser (Bio-Rad) to 2500 V, 25 uF, and the pulse controller to 1000 ohms.

9. Transfer the solution containing the cells and DNA into a cuvette with a 0.2 cm electrode gap. Tap the cuvette against the bench several times to get cells to the bottom and remove bubbles.

10. Place the cuvette in the pulser and expose to one pulse (time constants are usually between 15.0 and 25.0 msec).

11. Add 1 ml of M-ADC-TW broth, resuspend the cells, and transfer to a round bottomed 15 ml polypropylene tube. Incubate at 37°C for 3 h.

12. Plate 300 ul cells on selective medium.

*The bugs can be aliquoted into Eppendorf tubes, frozen quickly in dry ice-ethanol, and stored in liquid nitrogen or -70°C. When ready to use, thaw slowly at room temperature. Wash cells in 10% glcyerol twice.

实验步骤 2

这份免疫沉淀实验步骤来自同一个实验室，第一份来自出版稿（Rosen et al., *J. Biol. Chem.* 264：9118～9121），另一份是实验室实际使用的实验步骤（西雅图，华盛顿大学，Alan Aderem 的实验程序）。

68K 蛋白质的免疫沉淀——^{32}P 标记的 68K 蛋白质通过抗血清从细胞裂解物中免疫沉淀出来，该细胞裂解物中含有等量的蛋白质，这些蛋白质作为抗血清直接作用于前面所介绍的牛脑 87K 蛋白质（4）。有些情况下，用抗血清直接作用于纯化过的鼠脑 68K 蛋白质。这两种抗血清能产生同样的结果。根据 Laemmli（9）方法通过 8% SDS-PAGE 凝胶电泳，可将免疫沉淀下来的 68K 蛋白质分离开来，用 Kodak X-Omat X 射线胶片和增强屏通过放射自显影显示^{32}P标记的 68K 蛋白质，在显示的地方，放射自显影可在 LKB 超级扫描显像密度计中被扫描到。

免疫沉淀实验步骤

用约 100μl 裂解缓冲液在冰浴上开始溶解细胞（蛋白质浓度为 1.5μg/μl），以下步骤均在 4℃进行。

预清洗 50μl A 蛋白 Sepharose 填料（Sigma # P-3391）(50% 半流体混合物在 PD 中)，加入填料并在 4℃ 沉降 15 min。

4℃，7000 rmp 离心 2 分钟，在 TOMY 离心机中旋转转子。

小心将上清液转移到新的 eppendorf 管中。

将 5μl 抗体加入 150 μg 蛋白质，4℃ 沉降 1 小时。

加入 50μl A 蛋白 Sepharose 填料，4℃ 沉降 15 分钟。

按上述条件离心，取上清电泳确定抗体的消除。

用洗脱液 A 清洗填料 2 次，用洗脱液 B 洗一次，用洗脱液 C 洗一次。

加 1 ml 缓冲液，涡旋，如前离心，弃上清。

用 SDS 上样缓冲液重悬填料，煮沸 5 分钟，走 SDS-PAGE 凝胶电泳。

A 蛋白 Sepharose 的制备

1.5 g A 蛋白 Sepharose 填料加入 30ml PD。

4℃ 沉降 15min。

4℃ Kneewell 离心机 1500rmp 离心 10 分钟。

吸气。

重复洗涤过程两次。

加 6ml 新鲜的 PD 洗过的填料，终体积 12ml。

加入 2.4mg 叠氮化钠（终浓度为 0.2mg/ml）。

实验步骤3 实验步骤可以是一个过程和一个实验，可能被张贴在专门仪器旁边。

用ZEISS摄制漂亮的荧光照片

打开显微镜（右面、后面）。

安装照相机（右边）：

连接红线和红点并拉出金属盒罐；

滑动把手；

使用曲柄确保金属盒罐中没有胶片（按前、右方的按钮，稳定的光线表示有底片，若没有底片就会有闪光）；

取下金属盒罐；

按银色的按钮打开底片固定器；

使底片滑行，拉过线；

关闭底片固定器；

将底片盒放入容器和金属罐；

向上旋转盒罐；

按B（前方按钮）3次送入底片；

设定ASA（显微镜前面）。

打开荧光灯泡（右边盒子中）。

切断可见光源（左边黑色按钮）。

设定荧光滤器（右边黑色按钮，从上数第二个）。

第一次停止，4行=绿色为罗丹明；

第二次停止，3行=蓝色为荧光；

不要在荧光灯泡亮着时从所有方向拉开滤器——你会伤及眼睛。

聚焦：

关掉目镜可见光（右边顶上黑色按钮），你会看到“+”字，运用它确保聚焦合适，但灯光会非常暗；

按A（右边前面按钮）拍照，右边的曝光仪会告诉你曝光进行的程度，在1.3200 ASA完成曝光要用15～30秒，160 ASA要超过3分钟；

滑行滤光器（在物镜后面），用于阻断荧光，打开可见光按钮（左后边，可拍照可见光照片）；

卸载照相机：

拉出金属盒罐；

用曲柄将底片完全卷起来；

将胶片从金属盒罐和固定器中移出并重新装上金属盒罐；

关掉开关：

关掉荧光灯泡开关；

关掉电源开关；

用擦镜纸轻轻的全面的擦拭物镜。

解释结果

你必须检查你的数据，对细节给予同样的注意，这些数据和细节能便于你分析竞争者的实验，列出数据并好好的问问自己。

1. **实验成功吗？**检查你的对照，首先看看你的程序性对照以确信你的仪器正常工作。细胞“喂”过了吗？分子量对照是否按你预期的情况在运行？检查正对照，如果正对照起作用，那么你的实验可能是正确的。再看看负对照，如果这里出现了你不希望出现的效应，你应该决定这是真正的结果或者仅仅是背景。如果你的负对照是阴性的，一切都可能是正常的，如果是阳性的，则可能是计划不正确或由于其他变量在实验中表现出来的结果。
2. **结果是什么？**与对照相比，减小背景的影响，你得到结果了吗？结果明显吗？2倍还是50倍？将所有的结果输入电脑进行制表，这样就不会因主观因素影响数据比较。两个结果是增效的还是附加的？结果随时间有变化吗？
3. **实验的含义是什么？**结果有什么意义？是你期待的结果吗？对于错误的结果你是否有什么解释？需要附加对照来帮助理解吗？
4. **其他研究者理解这个实验吗？**与实验室的其他人讲讲你的结果，最好是和给你实验程序的人和那些有熟练技术的人员讨论。回头再看看论文的背景，除非实验的结果能够重复，否则不要太兴奋。
5. **实验结果可以重复吗？**再做一次实验，包括能强化结果分析的对照和解决你实验中的疑问。

学习解释实验的惟一方式是多做些实验，你会发展出一种感觉，这种感觉可以知悉到实验的意义或实验需要什么。不同类型的实验经验会使你迅速“了解”什么时候实验成功了或没有成功，多作一些实验。

当实验不成功时

1. 如果是操作程序问题，检查你的仪器，确信插头已连接好，使用的是正确的缓冲液，仔细看看笔记有什么忽略的内容。
2. 重做实验，这是常常涉及到的问题，因为许多正负对照的错误就是操作错误。
3. 如果问题再出现，重复实验有疑问的部分，实验常常需要正对照和负对照。
4. 当你认定可能的问题所在，做一个小实验看看问题是否能被固定。不要试图跳过问题开始其他的实验——要等到结果被解释后再做。

例如，如果在你的实验中负对照有很强的信号，那么只在非常小的可重复的实验中检查负对照或其他途径获得的负对照，以与正对照相对比。如果仅仅是原始负对照“行为”失常，这可能是负对照的问题，而不是实验结果的问题。如果所有负对照都出现阳性结果，你必须开始检查缓冲液和其他成分。

5. 当你不能找出问题的原因时，尽可能收集建议并做你能做的事情，重复实验，重复，再重复!

> **困难在于如何区分那些可能会成功和永远也不能成功的实验，当具备足够操作经验时，这点会变得容易些——但是这永远是实验台生活的一部分!**

转换项目

多数项目因希望和兴奋而启动，当给以支持和开始探索时，许多时间被投入到实验中，研究者可能会失去希望，感情和自尊关系到项目的成功，有时候可能必须放弃一个项目。

作为一个科学家，你急需了解何时该停止项目的进行，因为存在大量的感情投资，你总是不愿意做这些决定，你该请求帮助并接受建议。

> 在得到技术之前总是先有构思，不管多么特别或重要的构思，如果你不能证实它，那就不应该对它做些什么。

了解什么时候停止项目并不总是一件清楚的事情，实际上，几乎非常不清晰，这其中有一些暗示：

- *数据不能重复*，如果你不能重复你的结果，即使你心里非常相信，也不能再进一步进行这个项目。也许是特别的鉴定和仪器价格的问题，这些都应该在放弃项目前调查清楚。也有可能这些变量是系统固有的问题，或者影响不大，或者你研究的效果太小，无法通过现有的技术探测到。
- *项目没有主要研究者的支持*。实验室中每个实验人员拥有的独立程度完全不同，在一些地方，你会选择自己的项目并设法开展研究，因而很少有机会得到 P.I. 的实际指导。但要获得建议和意见，就必须要倾听。即使你具备完全自由的权利，继续从事那些 P.I. 不信任的项目也是没有意义的。你很难能够做好连实验室领导都不喜欢的项目，当然，你可以用自己的数据说服他们，如果没有效果，还是要考虑更改项目。
- *项目方向已改变*。非预期的结果会将实验引到研究者不愿走的路上去。例如，有个学生在果蝇实验室开始研究一个被认为对果蝇生理作用非常重要的蛋白质，经过克隆并测定基因序列后，发现该蛋白质与哺乳动物神经发生相关，而在果蝇中的作用不大，该项目就被更改了。该学生必须决定是到有装备的果蝇遗传学实验室来研究神经发生还是进入其他实验室与他人合作，或者干脆放弃该项目。

> 主要研究者一般很少因为个人原因安排成功几率很少的项目。这种情况经常存在，即虽然他们有感兴趣的想法，但却没有机会进入研究。如果你觉得你正在做牺牲，那么立刻做点什么，告诉主要研究人或者部门的其他人员，你必须有评估能力并拥有敏锐及正确的判断力。如果他们拒绝将你调离注定失败的项目，你应该考虑离开实验室。

- *可能仍然不是技术的问题而做不好实验*。首先，不要被你单位的设备或试剂所限制，如果你需要其中一些，那么找到得到它们的途径。永远也不要忘记你能创造你所需要的工具，并一直保持这种欲望。你可以走在你实验的前面。你可能有十分重要的问题，

但你不能用现有的技术清楚地回答它们，那么你的工作也仅仅是空想和不完整的。

- 项目太难。项目的难度应根据工作的时间来判断，如果你的签证只有两年期限，那么是不会想要研究 4 年或更长时间的项目的。一种选择是由某人接手该项目，与他分享该荣誉。转换项目并不是失败的事，大多数对失败的害怕都来自于无经验的研究者，他们倾向于行不通的项目。

“在雨中等公共汽车”或“我在这个项目上花费了太久的时间现在该放弃了”

你到达公共汽车站，等待公共汽车的到来，时间已经晚了，你一个劲的看手表，又看看雨中的街道，这趟汽车从来不晚点，但是今天晚了。如果快点走到街道的拐角，你可以搭乘其他的公共汽车，但是你已经在这辆公共汽车上等待了太多的时间，如果你刚离开后它就来了怎么办？

是的，如果来了怎么办？如果你搭上其他的公共汽车，你真正失去了什么呢？研究好比在雨中等车，这里没有新的迹象告诉你什么时候必须做出一个正式的决定。不用担心如果你放弃项目会浪费多少时间，想想当你应该放弃而没有放弃时，你将会浪费多少时间。

（赵迎春　王维荣　黄伟达）

参考文献

Barker K. 2002. *At the helm: A laboratory navigator.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Bausell R.B. 1994. *Conducting meaningful experiments: 40 steps to becoming a scientist.* Sage Publications, Thousand Oaks, California.
Covers the philosophy of experiments, deciding whether an experiment is worthwhile, and analyzing and reporting the results.

Boss J.M. and Eckert S.H. 2003. *Academic scientists at work: Navigating the biomedical research career.* Kluwer Academic Publishers, New York.

Brown S., McDowell L., and Race P. 1995. *500 tips for research students.* Kogan Page, London.
Intended for students but useful for all researchers, especially ones in an academic environment. Contains not only tips on setting up experiments, but practical advice on such topics as coping with uncertainty, attending conferences, and developing your institutional know-how.

Carey S.S. 1993. *A beginner's guide to scientific method.* Wordsworth Publishing, Belmont, California.

Carr J.J. 1992. *The art of science: A practical guide to experiments, observations, and handling data.* Hightext Publications, San Diego.

Koch A.L. 1994. Growth measurement. In *Methods for general and molecular bacteriology* (ed. P. Gerhardt et al.), pp. 249–276. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Koosis D.J. 1997. *Statistics. A self-teaching guide.* John Wiley & Sons, New York.

Ramon y Cajal S. 1999. *Advice for a young investigator.* MIT Press, Cambridge,

Massachusetts.
Stent G. 1982. Prematurity and uniqueness in scientific discovery. In *Scientific genius and creativity: Readings from Scientific American* (ed. O. Gingerich), pp. 95–104.
Wald G. 1968. Molecular basis of visual excitation. *Science* **162:** 230–239.
Woodward J. and Goodstein D. 1996. Conduct, misconduct and the structure of science. *Am. Sci.* **84:** 479–490.



100
80
60
40
20
0
0 1 2 3 4
auto of
X395 strain
increased evidence
str. 0.2 0.4 0.6 0.8
A1 24
A1B 1 16
A2 30 5 92 89
B1 83 93 7 16
98
densitometer reading of
specific bands suggest
a positive influence
between strain intensity

第 5 章　实验室记录本

实验室记录本用于记录你实验的方法和结果，如果实验室失火，首先应该抢救的是你的实验记录本，电脑、冰箱里的质粒、实验仪器等等都没有你的原始数据有价值。有了实验记录本，你可以写论文、计划实验和进行数据的分析和处理，如果没有实验室记录本，那就等于你在实验室一无所有。

你的实验记录本应该保持干净和完整，如果实验中某一方面出错，可以根据实验记录找出到底出了什么问题。你前面的实验是否使用了太老的细胞？培养缓冲液是否配制正确？使用的酶是不是突然失活？你实验室的记录本上应该能为你提供解决问题的线索。而且，另外一个科学家也可能解释你的记录。一份书写潦草的实验记录只能由它的记录者才能解释，这份笔记不但记录不清，而且更加令人怀疑数据的真实性。实验记录并不是一份欺骗别人的证据，而是科学家证明自己实验科学性的依据。

类型和格式

活页本或记录本？有许多记录数据的方式，在你花很多时间决定记录方法之前，最好查证单位或主要研究者要求的记录格式。一些公司和研究机构对于数据的记录格式都有严格的要求，这并不仅仅为了防止欺骗而且有保护作用，如药物研发和/或诉讼。

例如，在一个国际制药公司里，无数的实验记录本必须签字，无数页的实验室记录必须每天保存并与非项目相关人员共同签署，而且实验记录本每天晚上被锁起来。实验记录本的保存是不固定的，每年都要被制成缩影胶片进行保存。实验记录从来都不被认为是个人财产，当一个化合物被考虑将用于人体试验时，实验记录的数据和计算要拿出来供一批人检查错误。

不用说，并不是每个实验室对于实验数据的记录都有这么多的要求，如果你被要求进行严谨地实验数据记录，你就该那么做。你将永远不会后悔这样记录数据，并且可以很好地处理实验细节上的问题。

学校实验室对于实验记录本的要求要自由得多，而且对于记录的方式也没有具体要求，甚至会有与记录本黏在一起的纸巾上或复写纸上记录数据的事情发生。请教一下主要研究者，听听他的建议，他多数会推荐给你一个记录本。

类型	优点	缺点
装订的笔记本	不会缺页	实验就像做的一样被记录下来
	防欺骗	没有逻辑性
活页记录本/文件夹	容易根据实验进行整理	活页容易丢失
	实验中容易记录数据	难以证明数据的可靠性
电子笔记本	容易阅读	必须备份数据
	容易进行计算	难以证明数据的可靠性

活页纸对于多个项目数据的组织有好处，在实验过程中对操作也有益，因为你可以使用写字板，而不用担心大堆的记录本。数据直接被输进计算机可以进行进一步的处理，如绘图和统计分析，非常简单。只有使用装订好的记录本，记录的数据才比较全面。如果你有机会选择记录本的类型，选择装订的笔记本。

☆ 寻找什么样的装订好的实验记录本

- 大的，大小为 8.5×11 英寸，可以在上面粘贴照片和一些打印数据，同时还留有一些空白处作笔记。
- 装订好的纸张，不破坏整本本子就不可能撕下纸张。
- 每页上都应该有页码标记。
- 白色的有格本。划线的纸张太受限制，空白的纸张很快会被弄脏。
- 副本页，第二页通常为黄色，被穿孔易于撕下。

有效使用装订的实验室笔记本

- 只用钢笔，永远不用铅笔。写在白色页面上，使用复印纸在黄色附页留下备份。
- 黄色附页将成为你实验记录的备份，用文件夹将它们进行分类处理，可以将不适合放入记录本中的所有数据的黄色页放在相应的文件夹中。
- 记录好所有的数据和实验，包括打印的数据和照片。
- 将实验记录本和文件夹放在不同的地方。

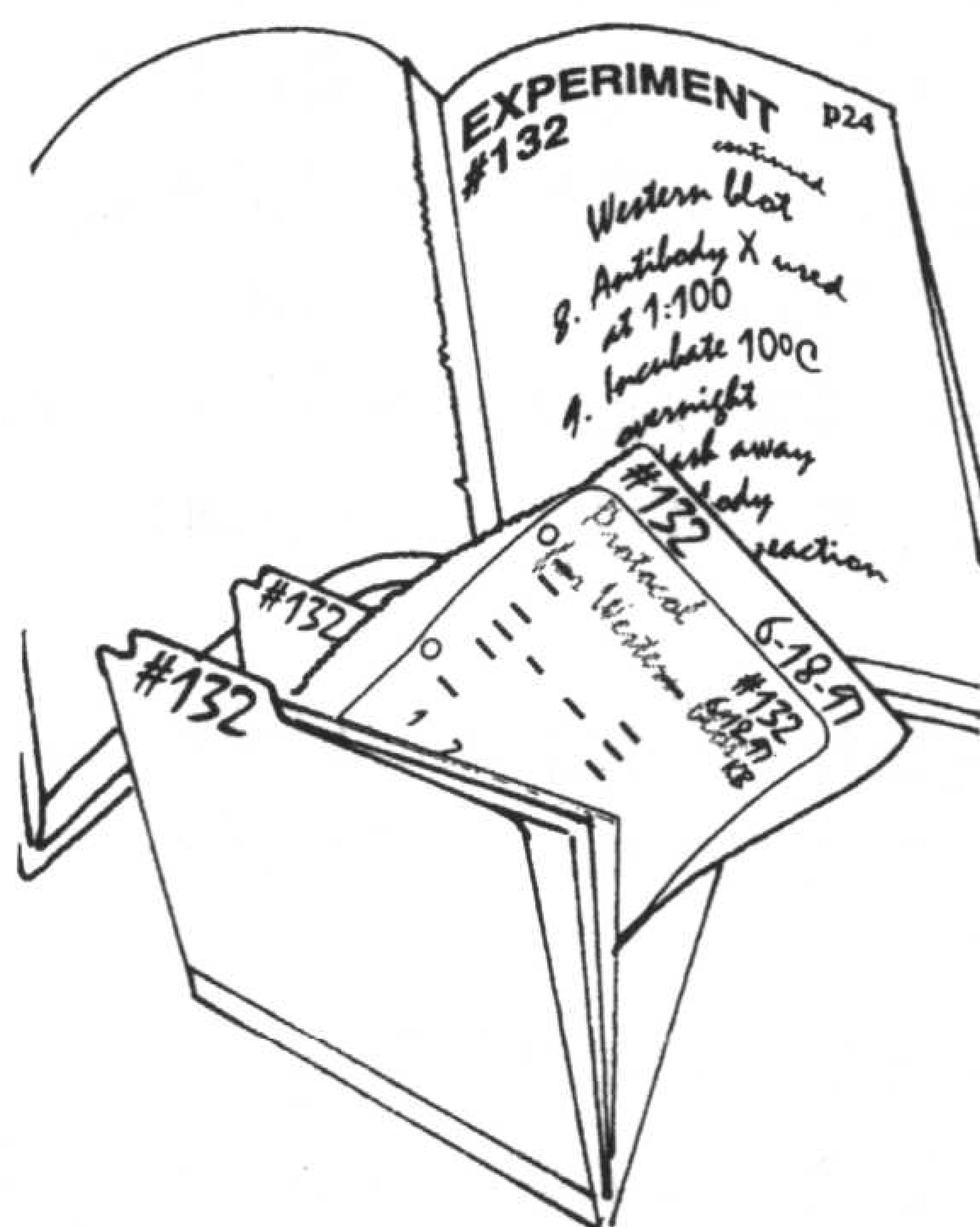


图 5-1　建立一个文档系统包括打印页、照片、X 射线胶片、附页和所有不能整洁记入实验记录本的数据，每个实验应该有独立的文件夹

内　　容

- **实验开始的数据。**在每一页上记录完整的数据（包括年），甚至是附加页。

- **实验题目。**简明是最好的，如“文库克隆的微制备”或“PMA 对纤维原细胞趋化因子释放的影响”。
- **目标简要陈述。**这是题目的延伸，多了一些细节，如上面的题目可以加上“检测插入的人巨细胞 cDNA 文库的大小”和“比较稀疏和浓密培养对 IL-8 释放的影响”。标题和目标可以结合起来。
- **实验描述。**实验之前，实验操作步骤应该写在实验记录本上，实验过程中进行修改，实验结束应该有一份修改和完善的实验程序。对你正在使用的操作程序应该给出参考文献，可以是杂志文章或实验手册，也可以是你自己发展出的参考文献，如“同 9/5/04 操作，见 13 页”。

在一张空白可粘贴的纸上记录下计算，包括计算的浓度、稀释倍数、分子质量和物质的量。

任何发生的和没有发生的都是数据，包括所有对照数据、标准曲线和零点数值。

可能的话，把实验中打印的数据和图片一起黏到你的实验记录本中。把所有东西放在一起，做好标记，一旦被分开可以确定它们的最初来源。将黄色备份页装订到文件夹中。

在收集所有的数据后，给实验结果写上一句总结的话。记下奇怪或失常的事，并记下对实验为什么失败或成功的评语。

> 如果要想使自己的数据更直观，可以进行图表绘制。例如，如果你经常使用 96 孔板，可以拍摄一张 96 孔板的照片，把它贴在记录本上，然后把实验的样品直接记在图片上。

目录表，你不可能记住所有的事，也可能记不住任何事。在实验室记录本的开始或一张单独的空白纸上，写下目录表、实验题目清单、数据和页码。这似乎很痛苦，但在你寻找特别的一套数据时可以节省时间。

记录所有的事。记录不是什么大事，但是别人（包括你自己）通过你记录的实验，可以很好地重复实验（结果）。

通常被省略的信息可能是你后来所需要的

1. 血清效价
2. 抗体滴度
3. 相关的其他人
4. 离心机型号、转速和温度
5. 培养时间
6. 洗涤次数
7. 管子类型和大小
8. 不曾预料的培养时间、洗涤和处理的延长
9. 使用的培养基
10. 缓冲液 pH 值
11. 细胞起始个数

12. 培养的年纪和代数
13. 琼脂糖及聚丙烯酰胺凝胶的浓度
14. 细菌生长期
15. 使用细胞的条件：稀疏或过分培养、粒细胞、黏附培养的悬浮细胞

维　　护

实验过程中记录数据并不代表你能完全理解实验内容，只有不断更新和回顾你的记录本，才能掌握主要的内容。

尽可能记录所有的事情。实验过程中尽力记下实验内容，如果不可能（如你在操作同位素），实验结束时马上记录。如果你不能这样做，最多第二天应该完成记录。千万不要一个星期里只在一天记录实验，一周20个以上的实验到了周末才记录可能会成为你的精神负担。

实验室记录本的风格可以有个性化，但是必须包含一些关键的元素（详见第4章实验步骤1、2）。

每周检查。经常用一个小时的时间浏览你的实验记录本。即使整个周末都在工作，星期五通常是方便的时间，用这个时间做以下事情：

- 把所有的实验数据、打印稿、X射线胶片贴到相关的实验记录中去，如果纸或图片小，可以直接黏在实验记录本上；如果纸或图片大，可以整理到实验文件夹里。大多数胶片需要合适的灯光才可以看清楚，小胶片不放在记录本里。
- 制表和作图。可以将一周的数据以图表的形式制作出来，但一定要在一周结束前完成。图表更为直观，利于解释，而且在讨论的时候胜过一大堆文字解释。在写论文或做科学报告时，你也可以避免再做几十幅图表。如果图表很小的话，可以直接贴在记录本上，大的图表可以放在文件夹里。
- 对于每一周的实验都应该做一个总结，浏览每个操作，然后用一到两句话进行总结，有可能的话多写一些，包括解释和对其他实验的建议。总之在记录本上写上能够找到的总结。
- 记录实验的目录。简单记录实验的题目和实验的日期，这样可以使自己的记录更有组织性，也能够尽快找到需要寻找的实验。
- 下周实验计划。当已有的数据在你脑中很清楚时，思考这些数据的意义以及接下来要做些什么。一个写下的总结可能不实用，但对于未来的工作很有帮助。

如果你不知道你的数据，实验是没有意义的。只有知道结果的意义才能计划实验、讨论结果、实现控制。

对你的数据和计划请求反馈。一旦理解了数据，与你的同伴或主要研究者讨论，不必等到完全理解后才开始讨论，但你应该知道数据是什么。

准　　则

所有权。实验室记录本属于实验室，不属于实验人员。如果你认为实验记录本对你

非常重要，在你离开实验室时想拥有记录本，应该与主要研究人商量，他们或许会让你带走一份影印件或者带走黄色备份。

不要担心你的实验记录本会反映你的个人，可以在记录本上记录一些个人注释、悲叹和怨恨，就像实验数据一样清楚彻底。但记录太多和实验无关的事情既不够专业，还会陷入窘境，因此尽量记录最少的属于情感信息的内容。

如果实验室某人的记录本在没有经过他本人允许的情况下被别人偷看，应该视为是一种侵犯个人隐私的行为。

公众对个人。实验记录本是精细的文件，是公共事务和个人记录的综合。在多数场合，它被放在办公桌上或者实验台上，除了“主人”一般不会有其他人阅读。不要偷看实验室其他成员的记录本，即使（或特别是）你想核实有欺骗性的数据，如果你怀疑有欺骗性，跟主要研究人说。如果你怀疑有人看你的记录本，可以把它锁起来，或者交给主要研究人夜间保管。

主要研究人查阅。通常主要研究人可以自由查阅技术员和暑期生的实验记录本，但不能阅读研究生和博士后的实验记录，因为这会被认为是侵犯个人智慧。但是，如果你的实验记录被查阅，请不要愤怒，特别是当主要研究人帮助你解决问题的时候。技术上说实验记录本是一个公用的文件，应该可以经得住仔细查阅。

存档文件。实验记录本和原始数据应该保存多久？由于空间的限制，许多实验室都不可能无限制地保留实验室记录，实验记录一般保留 5 年，只有在实验室负责人认可后才可以被处理。

不要处理以下材料：

- 当你刚开始进入实验室时发现的旧实验记录本
- 自己的实验记录本，即使超过 5 年
- 任何与正在研究的课题相关的记录本
- 电脑或抽屉中发现的数据记录

删除伪造的数据。

记录数据。实验记录本中的一个“错误”，当被在文章中使用后将随着时间被无限扩大，所以记录数据时一定要尽可能做到精确和真实。

不能删除你记录本上的任何一个数据点，有统计学的标准可以删除数据点。对数据的丢弃做到公正准确还是比较困难的。

> 也许你会为了一个肯定的数据而努力，在许多伪造数据的案例中，犯罪者都会责怪主要研究人，认为是他期望一个很好的数据，研究者是被迫伪造数据的。主要研究人需要好的数据也许不假，**但你的数据是你的责任，**你应确信记录的数据真实准确。

如果你要丢弃一个数据点，请在记录本上注明经过你作图和计算后删除的原因，写上“因为我想我已经摇过那个盘子”，或者“这个数据在其他六次重复实验中都没有出现”，或者“细胞生长状态不好”。不管是多么站不住脚的原因都应该写上，你必须清楚你不理会的是什么数据和为什么不理会。

June 3, 1992 COUNTS of ³H uracil uptake Mouse 5-26 D.1, D2, D5

	TCA D.1	TCA D.2	TCA D.5	D.1	D.2	D.5
–	3701.5	1529.4	187.7	4688.2	1496.8	322.6
–	1608.5	1633.6	309.9	4288.6	1496.0	2692.3
1:1 155	274.9	689.9	49447.0	382.5	4672.1	40883.3
1:1 155	275.7	3828.4	65954.2	271.5	3616.8	35166.9
5:1 155	17460.4	10108.0	96939.7	15998.3	11483.8	92498.5
5:1 155	16787.9	10901.8	101587.1	7943.9	11055.0	81693.5
10:1 155	665.8	16159.4	100727.0	6587.9	28667.0	98439.9
10:1 155	621.5	22503.8	101739.4	604.7	24266.9	76547.8
20:1 155	873.6	67394.5	146437.4	1164.8	69448.2	140389.3
20:1 155	778.4	78718.4	146044.4	800.2	64456.4	121926.8
5:1 coli	1988.0	1470.3	36800.3	20336.4	4990.8	5646.4
5:1 coli	903.3	27148.3	45760.6	23151.1	6158.7	3717.0
10:1 coli	15204.2	20207.2	46095.1	12424.0	6033.3	4796.7
10:1 coli	14104.2	26519.3	48387.4	16603.1	6569.3	4540.5
5:1 BCL 10s	1346.5	25314.0	2934.5	681.8	21829.3	1083.9
5:1 BCL 10s	1318.6	34581.4	1439.2	4192.8	21968.9	1113.4
10:1 BCL 10s	5222.3	2789.8	87991.0	4027.9	30749	7026.4
10:1 BCL 10s	3197.3	2170.7	81634.3	21299.8	26737	8199.4
5:1 BCL 20s	9905.0	1677.1	5110.7	11151.3	2154.8	1575.8
5:1 BCL 20s	8490.8	1620.2	1801.7	7213.7	1779.5	1170.2
10:1 BCL 20s	472.8	1390.7	5128.9	5813	6743.0	1943.2
10:1 BCL 20s	428.1	2554.8	2716.4	419.7	6450.2	1932.5

Added 125ul TCA

TCA samples washed w/ETOH only. (Kept at 4°C)
Plain samples washed w/H_2O + ETOH. (Kept frozen at -20c)

036

March 15, 1993. [155 RNA]

Using LEES DNA, inoculate the rest of DNA #3.* (4° walk-in) into 500 ml LB/AMP → SHAKE 37°C. MAXI-Prep tomorrow

RNA ISOLATION

KB grew up 6 500-600 mls 155. Isolated RNA in GuHCl, 3M KAcetate etc.

Reprecipitated 2x in GuHCl. Pellet look big but KB added glycogen. (we'll see after OD reading.)

Wash 2x in 70% ETOH. Spin 10', 13K. 4°c.
Pellets are a nice size. (Could be DNA!)
Reprecipitated in 1/10 vol KAcet 3M, 100% ETOH 2 vol.

3-16-93.
Spin down RNA 30', 15K 4°c.
SMALL PELLETS

SET SAMPLE, PRESS START KEY
λ 260.0 5ul → 600ul ddH_2O
No. A1
1 0.130 → LEE DNA 500ul TE.
2 0.068 → RNA 1st 155.
3 0.029 → RNA 2nd 155. 50ul DEPC

DNA = 121 df × .130 × 50. = 786.5ug/ml in 500ul → 393.25 ug

RNA 121 × .068 × 40 = 329.12 in 50 ul → 16.5 ug.

RNA 121 × .029 × 40 = 140.36 ug/ml in 50ul → 7.0 ug.
RNA at -20 in salt/alcohol.

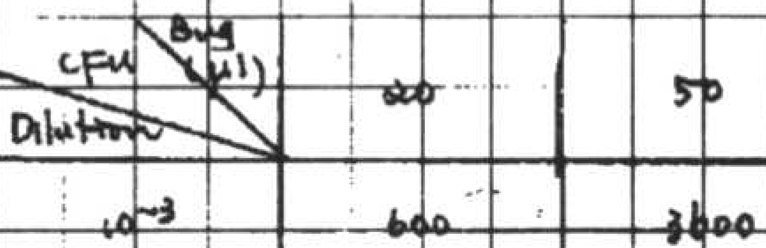
15:31 3/17 '93

260.0NM 0.029A

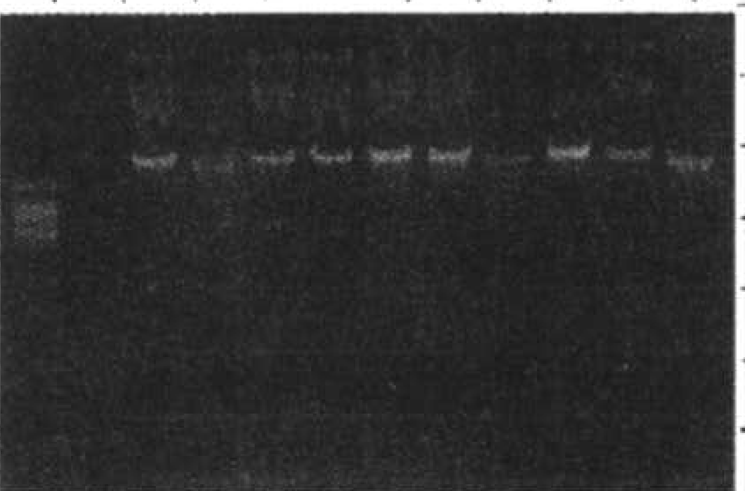
→ count colonies
→ grow up 10 colonies in 2ml of LB/0.2% Maltose/Kan, 37°C, o/n
→ miniprep DNA

Dilution \ CFU (Bug μl)	200	50
10^{-3}	600	3800

5.0 λ	DNA
1.5	#3 NEB
0.5	BamHI (20 u/λ)
5.0	RNase A
3.0	dd H_2O
15.0	37°C, 1hr



∴ Vector is not pYNB 178.



— Transformation of 155
200–400 μl 155 competent cells
0.5 μl each of 10 colonies / 10 μl pHY206 (0.14 μg/λ) for ①, ③, ③–⑦
10′ 4°C (on ice)

	⑦	①	②	③	④	⑤	⑥
→ electroporate at T =	2.5 kV	2.5	2.5 kV	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
R =	129 Ω	129	480 Ω	480	189	129	72	720
S =	1.45 kV	2.45	2.45 kV	1.45	1.25	1.35	1.25	1.25
Gap =	0.2 cm	0.2	0.2 cm	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
FS =	5.18 kV/cm	5.28	2.78 kV/cm	1.38	1.38	1.34	1.38	1.38
t =	1.33 msec	2.44	16.8 msec	17.1	8.05	4.08	2.95	10.89

→ 10′ on ice, 10′
→ add 400 μl of comp 7H9, 37°C, 2hrs

7 - 1 - 97
Immunoscreen — 16 day mouse embryo cDNA library in λEXlox® Vector

1. titer library
~ 1.3×10^4 pfu

2. make BL21
① grow BL21 O/N
② spin 20′ at 2000 rpm 4°C
③ resuspend the cells to OD_{600} = 0.5 in 10mM $MgSO_4$

3. plate (150mm 2XYT plates)
① { 2.5 μl original φ
747.5 μl SM
750 μl BL21 (OD_{600} = 0.5)
② mix well, at 37°C for 15′–20′
③ add ~8ml 2XYT top agar
④ plate, and incubate at 37°C for 7 hrs just until small plaques become visible (0.5 – 1mm in size)
⑤ apply the numbered IPTG-treated membrane to the plates
⑥ keep at 4°C O/N

4. treat the membrane with 10mM IPTG before apply the membrane to plate
① dilute IPTG in sterile dH_2O to 10mM
② 30′ prior to use, wet the membrane in IPTG sol. place the membranes on Whatman 3mm paper to air dry

(洪　洁　王维荣　黄伟达)

参考文献

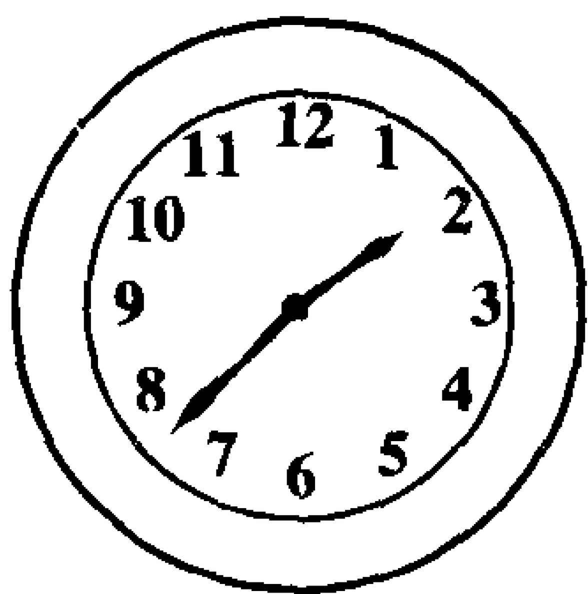
Barker K. 2002. *At the helm: A laboratory navigator.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Boss J.M. and Eckert S.H. 2003. *Academic scientists at work: Navigating the biomedical research career.* Kluwer Academic Publishers, New York.

Broad W. and Wade N. 1992. *Betrayers of the truth. Fraud and deceit in the halls of science.* Simon and Schuster, New York.

Carr J.J. 1992. *The art of science. A practical guide to experiments, observations, and handling data.* HighText Publications, San Diego.

Kevles D.J. 1998. *The Baltimore case: A trial of politics, science, and character.* W.W. Norton & Company, New York.



我们非常
感谢以下
人员的帮
助和贡献
ROC
THO
CELI
YUR
COL
BRU
NOU
NSH
HAO
ROB

第6章 陈述你自己和你的数据

如果你不能交流你的数据，那么它们根本不存在。你必须能够向比你懂得更多或更少的人解释你的实验结果以及实验结果的含义，这些交流可以通过讨论和科学报告或通过杂志发表论文和基金申请，你应该对两种方式都适应。如果你的第一语言不是实验室所用语言，很好地陈述自己可能是困难的任务，但还是必须要做。

陈述好你的数据并不是仅仅为了个人雄心的事，这对于你的生存很重要。

交流技巧

忘记认为科学家总是一个人独自在实验室中奋斗到午夜，与世隔绝的心中固有印象。当然，独自一个人从事实验占大多数时间，但是现代科学发展决不是在真空环境中进行的。许多发现都是在实验的基础上进行交流而得出的，因此在做研究的时候应该敞开心扉，学会与其他研究人员进行交流。

在实验室融洽相处

首先重要的是要向实验室的其他成员陈述自己，你做的大多数研究成就，为了实验室其他成员对你及你数据的认可，应该好好花精力和实验室伙伴相处。

第一章曾经提到，当你第一次进实验室时，应该遵守一些不成文的规矩，但是你和实验室其他人的交流应该随着时间的推移而加深。

- **主管研究人缺席。**实验室中的人常会抱怨主管研究人压迫性的呆在实验室希望知道实验室里每个细节进行的情况，或者他们从来不来。如果你实验室的主管研究人经常不在实验室，学会尽可能地主动与导师交流，有好的实验结果给他留一个便条，匆匆走进他的办公室5分钟，尝试和他一起吃午饭等等。这是你的事业，如果等到要他们给你写推荐信时他们还不认识你，那是你的悲哀。
- **实验室同伴。**实验室里有你一些空间上（通常情感上的）亲密的伙伴，他们是第一个看到你原始数据的人，最早知道你大实验失败了的人，第一个见到你沉思并给你实验提供建议的人。同时你也可以提供同样的服务给你的同伴，学会享受身边的科学意见和友谊。但在有些情况下必须允许有隐私，应该有让你的同伴独处的时间。
- **合作和信用。**虽然多数的合作发生在实验开始之前，但也有不能预计的情况。通常的问题是个人在实验中的重要性发生了改变，假定的第一作者在最终被接受的文章作者顺序中被排到了其他位置，这时候应该请主要研究人出面调解争端。
- **冲突。**多数实验室发生的冲突涉及到一个实验室成员对另一个实验室成员的愤怒。有人损坏了仪器而不作处理；没有完成分配好的实验室工作；用完试剂而没有预订；未经允许使用他人“私人”的试剂或设备等。如果你是被侵犯对象，应该直接处理

事情，而不要进行个人评论或者责备犯错的人。如果你是犯错的人，应该尽快承认错误和改正错误，不要申辩和怨恨。

另一种类型的冲突涉及才智（和感情），有的人会因为相信实验室其他人侵害了自己的课题，或者和不相关的人讨论敏感的数据而生气，这时需要双方进行协调，不必要主要研究人参与协调。不要把个人不满带给主要研究人除非问题很严重。

借助实验室临时会议，可以平息一些关于实验仪器使用问题的抱怨。

- **最后期限**。不管是自己还是别人的，都要严格遵从最后期限，这能有助于做事的组织性，而且对于其他帮助你的人来说，也容易使他们对这件事重视。当别人请你帮忙或者你请别人帮忙的时候都应该设定一个期限，例如，如果请别人帮自己修改手稿，你可以对他说："这周你能读完这份手稿吗？如果不行，请告诉我，我再请别人帮忙"。
- **苛刻的主管研究人**。主管研究人对于一个研究者的生涯有许多控制，有一些人对于这种权力总是处理的很糟糕。虽然在进实验室以前你已经调查过他的个人情况（通过询问实验室的其他人员他们在该实验室工作是否愉快），但你还是发现你陷入了令人不愉快的境地。这种困境可能有多种形式，你必须能够通过其中的重要性上找到解决的办法。从学生和博士后工作小组、单位人类资源部的调查行政人员舞弊情况的政府官员或者科系行政管理部寻求处理建议，了解自己在受到如性侵犯和其他非伦理行为中的权利。如果你认为有严重问题，保留事件或对话内容的证据。
- **宠爱**。实验室中，总会有几个人是受主管研究人关注和欣赏的。仔细观察，这样值得吗？可能你能从中学到些什么，但如果不值得，做自己的事情，学会不被打扰。如果你觉得会造成对自己有害的待遇，这仅仅只是小问题，集中精力在你的实验上，将来的受宠者一定是你。如果是这样，不要责怪现状，不要让它影响你，你可能成为明天的新宠。
- **闲谈和苛刻批评**。人与人之间的闲谈会使传递的信息不准确，为了和实验室的同事友好相处，不要因说其他人的闲话而破坏你和同事之间的关系。对待实验室的同事，应该尊重他人，多为他人着想，即使你不喜欢他。

  多数大实验室遇到问题时（如凝胶样品孔梳子的丢失、放射性冰桶丢失或者缺乏好的结果）都会找一些替罪羊来责备。不要随大流，说法可能是对的，但有可能会造成对某人不公平的扩大化。随着时间的推移，你该做出你自己公平的判断。

  通常一个实验室的人不喜欢从事类似工作的其他实验室人员（通常是竞争者）的做法。不要假定这个主意是正确的，继续诚实和公平地评价竞争者的工作，没有好的理由请不要藐视他人的工作结果，损人利己并不被人所赞同。
- **烦恼**。环境能够导致一个人假定太多而变得马虎，对种族主义者或者性别歧视者千万不要不以为然。如果你感到自己是受困扰的目标，那么在你决定采取官方行动之前，把你的想法当着实验室其他成员的面坚定地说出来。
- **是或不是**。你的数据好，主管研究人也认为你好；数据不存在，他则认为你什么也不是。不要依赖结果来体现个人价值。

对于非英语母语的人

- 在实验室杜绝说母语的欲望，即使大多数实验室的成员都讲同一种语言。在工作的时候讲英语。
- 在实验室用英语记录笔记。
- 参加英语读写班。许多大学有交流小组，在那里可以每星期用英语和非英语母语与人进行交谈，而且可以自己准备话题与那些给你指导的人多交谈，让其他实验室的人知道你的问题所在。
- 向母语为英语的人请教阅读，并请他修改你所写的一切。
- 对于自己不知道的事情，请其他人讲清楚，特别是实验程序，如果对于别人的解释还不满意，可以请他写下来。
- 在做任何口头陈述以前，即使是非正式的实验室讨论会，应该先讲给一个母语是英语的人听，综合他的意见后再讲一遍。
- 请教一个讲你母语的人，但是最好用英语进行读和写，请他来评价你的演讲和文笔，讲同一语言的人容易犯同样的错误，因此这个人有可能指出你的错误。
- 如果是第一次报告会，准确写下你将要说的话，请别人进行修正，如果太紧张而记不住要讲的内容，那么读你所写的讲稿。
- 与实验室的人一起参加活动，每过一段时间，可以一起吃饭或者出去聚会，努力参与交流，不要忘记请别人经常纠正你的错误。

- **语言**。如果英语不是你的母语，尽可能学习读写英语是非常重要的。实验室的大多数人会尊重你的实验技能和欣赏你使用另一种语言来完成科学研究。如果他们不了解你，实验室和外面的有些人还是不愿意和你一起工作。没有好的语言能力，工作上你会很难提高，同样也不能获得一份你能够胜任的工作。
- **推荐信**。推荐信涉及很多问题，基金申请、寻找工作以及学位授予（职称评定）都需要推荐信。这不是说为了得到推荐信就讨好写信的人，但是一定要成为科学团体中的一员，这样你可以容易地给出几位科学家的名单，他们熟悉你和你的工作。如果你找不出三位科学家帮你写推荐信，那么说明你还没有和其他科学家交流好。
- **个人和政治差别**。实验室里几乎讨论所有的事，有时候会能达到白热化，尽量不要让不同意见影响工作。
- **社交**。非常重要！许多实验室同伴会一起吃午饭或者喝啤酒，在实验室或外面的聚会应该参加，至少偶尔参加。
- **时间**。实验室里没有小于半小时的时间单位，如果你要安排时间和某人一起，慷慨地留出额外的 30 分钟做准备。
- **假期**。和公休假一样，可能也有非公休假。看看实验室的休假政策，尽量适应它。如果实验室习惯上没有假期，可以自己申请，但是要准备好处理别人对自己的评论。

  在实验室工作忙碌的时候千万不要安排假期，告知主管研究人，你度假的日期和长短，写下你离开和回来的日期交给秘书。在自己书桌和实验室台上留下你离开和回来的日期，这样实验室的其他人可以知道你什么时候回来，如果只离开一天，也应该让其他人知道。

联网

在你的领域里利用网络和别人交流是非常必要的，需要花费精力。但如果不是特别喜欢交流也不要着急，网络是很有用，但是还有其他和别人交流的方式。

- **网络聊天室和新闻组**。网络上的科学聊天室和新闻组允许你在网上交流科学信息，你可以做任何事情，包括可以询问缓冲液的配方或者征求其他单位的工作职务。
- **合作**。好的合作令人很愉快。来自不同专长或互补专业的两个或者更多的合作者，完成的事情可以超过他们的总和。合作令人期待和高兴，但一次坏合作的损失是无法弥补的。

  如果没有和主要研究人商量，千万不要和其他人合作，即使是非常偶然的。

  所有合作花费的时间比你想像的要多，大家统一意见一般开始于某一个实验的进行，但是之后会有更多的对照和实验被不断扩展。如果你没有时间，或合作变成单方面的，或者没有结果，应该尽快停止合作。
- **自信**。不要被题目和冗长的 C.V. 所吓倒，不要害怕与比你懂得多的人讨论你的数据。
- **兴趣上的冲突**。许多合作导致你们走到一起，开始时务必了解你的合作伙伴不是你的竞争对手。

  阅读竞争对手的基金申请或原稿是另一种兴趣上的冲突，如果你会被阅读的数据所影响，那就不应该再继续下去，这就是你为什么不能阅读别人实验手稿的原因。
- **好的数据**。好的数据是进入科学团队的护照，当你是胜利者时，每个人都想结识你，如果偶然的机会你成功了，应该抓住这个机会尽可能多的认识其他人。改进你的数据及自身，在荣耀面前不应该止步，不要认为好的数据可以掩盖不好的数据。
- **电子邮件**。电子邮件是一种索取质粒或者询问实验程序的简单方式，向在会议上认识的人发一封邮件或者向某人补充说明一些情况。电子邮件对于发信者和收信者而言都花不了太多时间，却能和外界保持联系。
- **系际间的学术报告会和杂志俱乐部**。在课题组外和科学家一起进行论文会议是与科学家交流最简单的方法之一，如果在你的研究领域没有交流会议，可以设法召开一个。
- **会议**。每年至少参加一次会议，即使你没有参加会议，也不要放弃申请会议资料。一旦你参加会议，就应该尽可能地学习这一领域的知识并且与尽可能多的人认识。利用会议的任何机会拜访同事或你主管研究人的朋友。会议海报是你参加会议时联络其他科学家，特别是你希望在会议期间遇到的高级科学家，这是与他们交流的最好地方。不要只是阅读海报，要提出问题和作出评论。多数人愿意与你交谈，如果希望和他们继续联系，给他们发个电子邮件。

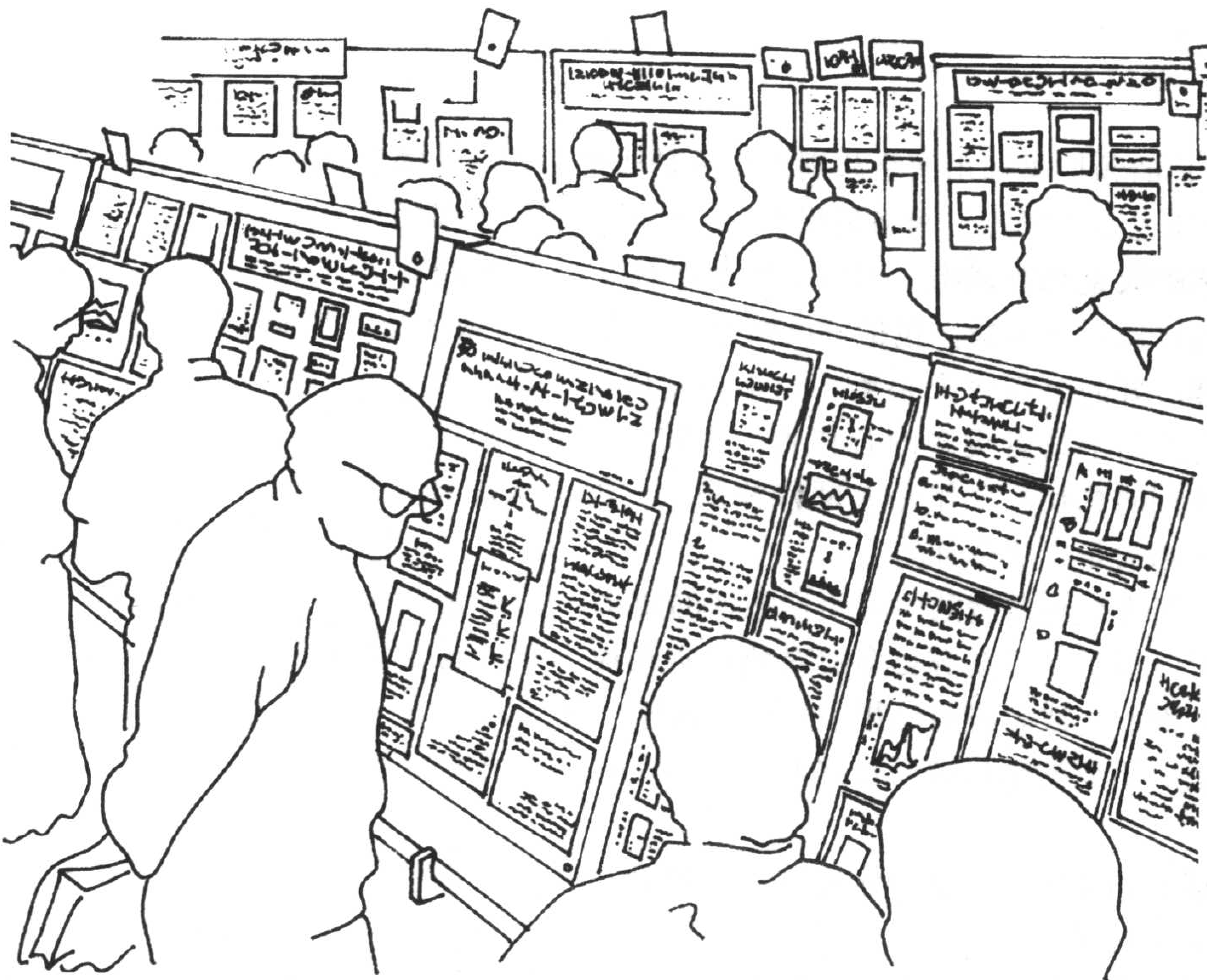


图 6-1　海报会议的数据建立，实际会议的研究者要解释数据 1～2 小时，布告板可能被展示一个上午或一个下午

怎样做一个会议海报

- 如果有人对你的海报感兴趣，应该对他说"需要我给你讲述一下吗?"而不只是安静地站在海报旁边。
- 如果他说"不"，那就提示他你欢迎他的提问，不要再打搅他。
- 大多数人都会说"好的"，这时你应该对海报做一个简明扼要的介绍。
- 介绍完就停下，你可以让他继续讲。人们对海报的内容都喜欢评论一下，不要因为别人匆匆而来和匆匆而去感到气愤。
- 如果你和某人交谈得很投机，这时还有其他人会看海报，让每个人都知道你想认识他们，尽快和他们交谈，彼此交换地址和电话。如果认为 5 分钟的谈话不够，可以安排一个座谈会。

出席报告会

保持清醒！有时可能真的避免不了周四下午四点钟时的昏昏欲睡，你坐在一个拥挤的会议室里，"听"研讨会上的讲演。灯火昏暗，房间温暖，讲演主题乏味……。但是要尽可能主动地集中注意力，在研讨会上

仔细选择你参加的报告会，不要参加自己不想听的报告会。

睡觉、不集中、斜靠和打呼等被认为是对演讲者不礼貌的行为，如果不仔细听讲，确实是浪费时间和精力。

另外，去参加一个没有意义的报告会确实是浪费时间，除非有什么政治因素让你不能离开，否则就听听而已。

即使参加了一个了无生趣的研讨会，也可以尝试着集中精神听一听。如果实在无趣，那就立即离开。

在研讨会上应该做到

- **主动听讲**，尝试听懂演讲者所讲的内容。
- **预知**演讲者所用数据的出处。
- **把握**演讲者所讲的内容重点，关注他所讲到的实验与你所知道的领域的关系。
- **回顾和总结**他所说的内容。
- **关注**演讲者，从幻灯片、黑板以及投影仪上获得自己感兴趣的资料后，应该继续注意演说。
- **记笔记**。尽量记录最完整的内容。
- **区分**演讲者没有证据支持的论证和事实。做出判断，但保持思路开阔，对自己不懂的问题应随时提问。
- **提问**。在非正式的报告会上可以随时提问，但在正式报告会上，如果有问题的话，应该等到报告结束后再提问。
- **端坐**。听讲时不要坐姿随便，最好双眼一直关注演讲者。

提问

问题和答案是科学研究的核心，所以你必须抛开一切顾虑自由地提问。

在多数报告会上，几乎没有人提问。为什么？难道没有人有问题吗？如果他们仔细的话，当然会有问题。多数人不愿意当场提问是因为他们觉得不安全，对于这一现象的合理解释有：

- 我的问题可能其他人不感兴趣，所以我将在会后提问；
- 不能准确表达我的疑问，它太复杂；
- 我可能知道答案，这是我研究的领域；
- 这是一个很简单的问题，每个人都知道答案；
- 我不想在公共场所被别人看成无知；
- 我没有看到那张可以解释问题的幻灯片，我不能让别人知道我没有集中注意力。

在报告会过程中形成问题，争取每个报告会至少提出一个问题，仔细听回答，也许还会有另外的问题。

获得答案时，可以用点头、微笑或者说写什么来答谢演讲者的回答。问题不要带有攻击性。如果你真的要问一个有敌意的问题，请问得专业和礼貌些。

提出你只想获得答案的问题，不要提出因为你想别

可能你会紧张，但应该学会适应，重要的是在所有实验室会议和讨论中你是处于主动，还是仅仅作为一名被动的参与者？

人知道你的博学或你自己的实验而提出的问题（如：“这是一个很有趣的谈话。现在，在我们实验室……”），这是一个很不好的动机。

口头表述

考虑你在与别人进行口头讨论，讲话时不用拘谨或正式化，但必须做到有组织和思考，这一规则同样适用于国际会议上的对话。

☆ **准备**

- **准备你要说的内容。**无论是一对一与主要研究人的交流还是在国际会议上作报告，应该准备好自己将要陈述的内容，尽可能了解要陈述的题目。
- **了解你的听众。**有相互的想法是你作表述的责任，如果你要在一个陌生的地方作演讲，提前几个星期了解听众的背景状况，他们是学生、内科医生还是药剂师？根据听众的不同准备不同的演讲内容。
- **演讲练习。**单独一个人练习，至少在演讲前 3 天在评论者面前练习一次，这样才能有时间对演讲的内容做修改。练习的时候可以使用一些直观的视觉教具，如果超时应该缩短报告内容。

☆ **执行**

- **不要神经紧张。**把演讲想像成为是令人激动的能激发热情的事情，多数人都容易紧张。
- **表述清楚明白。**避免喃喃私语、讲得太快或太慢和发音不准确。
- **注意习惯性的发音并消除它们。**不要在说完每句话时加上“呃”、“呒”或者“好的”等助词。
- 报告时**注意时间。**如果报告的时间是 45 分钟，最好准备少于 45 分钟的演讲内容，因为有可能还要占用一些时间做其他事情，比如说要切换幻灯片，时间短点更好。
- **全身心的投入到**演讲中，可以让你和你的听众都集中注意力，这样会让每个人都觉得报告会是一个大型的交流会。

研究报告会

实验室的报告会，通常是将自己的研究数据陈述给实验室或者院系成员。虽然你要不断地和实验室负责人以及实验室的其他成员一同讨论实验数据，但在实验室报告会上是你第一次将自己的实验结果和系里的成员分享。对于一个研究者来说，在实验室里做汇报是第一次坐下来把自己的数据整理成故事讲给别人听。为了避免例行常规地分析自己的数据，要用足够的时间来准备和组织好自己的汇报。

汇报可以是正式的也可以是非正式的，依据其类型不同，也应该进行不同的准备。每个实验室对于汇报类型的要求也有不同。

> 实验室研讨会上汇报的数据都应该是真实可信的。

正式的实验室报告会

- 这也许是一个面向全系的报告，最好把它当作国际会议的报告来准备。
- 有可能在会议厅或者礼堂中进行
- 一般持续 45 分钟至 1 小时
- 陈述的数据一般用幻灯片进行展示
- 陈述时要保证流畅和通顺
- 要像关注数据那样来关注问题和方法
- 允许少量的技术疑问
- 不应该提到专业术语，要讲得比较大众化
- 结束后要留下一些提问和回答的时间

非正式的实验室汇报

- 只有实验室成员参加
- 也许在实验室或者图书室举行，还有可能在会议室举行
- 大约持续 30 分钟到 1 小时
- 可以通过投影仪或者黑板展示电泳胶片数据
- 是一个解决问题的讨论会
- 关注数据，提出技术难点问题进行讨论
- 允许使用专业术语
- 允许在报告会的过程中进行提问

> 避免报告前的“做更多数据综合征”，代替在报告前走测序胶的是充分利用时间组织和准备好你已有的数据。没有人会关心你多测定的500个碱基，但他们会介意一个数据混乱的报告会，每个人都知道实验是在报告会之前的几个星期获得的。

非正式的实验室报告会

- **目的**。非正式的实验室报告会是真正的工作会议，你要做的并不是给别人留下印象，而是要学习。必须要像准备正式报告会那样去准备非正式报告会，报告时关注的焦点应该着重于解释自己的实验，它们是什么？结果是什么？结果是好还是坏？为什么？
- **前言**。对你实验的理论和背景知识做一个简短的介绍，即使听众了解这个领域，还是应该说明实验所涉及到的领域。介绍背景知识不要超过 5 分钟，直接进入需要讨论的实验研究，还应介绍一些新颖的方法和技术。
- **数据陈述**。有秩序地整理好数据、幻灯片、电泳图谱、图表和照片，可以用投影仪来展示胶片，也可以把照片和图片悬挂起来或者在黑板上画图。

原则上按数据获得的次序陈述，但应该有思想上的逻辑性，每次都应该解释为什么做这个实验。

展示的数据应该尽可能地做到完善和完整，除非在实验过程中遇到技术上的难题。说清楚漂亮的电泳数据是典型的还是偶然的，应该进行多次试验来重复数据。

你应该陈述好的数据，汇报时没有必要把所有的数据都罗列出来，只要汇报一些关键的数据就行，除非你想强调技术上的难处。

做好统计和其他分析，你没有必要展示所有的数据，但应该提供坚实的依据。如果要展示一张复杂的电泳数据，你一定要清楚每一条泳道是什么，即使是只有三条泳道的数据与你的实验相关。清楚你的方法学，报告不是多次说“我不知道”，对于你工作的小领域，你应该知道所有的事情。

感谢别人对你在实验中给予的帮助，不要忘记感谢知识上的贡献。

对你陈述的每一个数据作一个总结。对每个实验小结论作个总结，你的实验是否成功？讨论你的实验目的是已经达到还是没有，为什么？向听众重新讲述你的实验目标和还要做什么实验去达到目的。

- **回答问题**。报告时回答有关实验的问题，如果有人提出了许多关于背景知识的问题，似乎只是没有抓住你报告的重点，由于报告时间短，你可以请他等到报告结束后再回答问题。利用提问时间回答你自己的问题，你可以请听众对特别的实验提供建议，或者建议一个操作程序。

正式的实验室报告会和会议

- **目的**。一个正式的报告会应该是一个结构紧凑完整的故事，结尾不松散。报告的背景知识、基本原理、方法、数据和结论都应该完整，具有逻辑性、明显性，并能够吸引各种类型的听众。不要太期望自己的报告都被别人所肯定和接受。

> 讲述整个的故事，要让人们知道他们听的是什么。通过浅显易懂的理论来揭示令人困惑的疑问。

- **前言**。前言至少要用 10 分钟时间陈述。用简单的句子阐明你工作的所有问题，说明为什么这个问题是重要的，让听众知道为什么这个课题值得研究（和为什么值得听）。

  介绍问题相关的背景知识，听众可能情况多样，应该让所有听众能够听懂你所进行的研究课题的基本原理和实验方法。介绍自己接下来将要报告的内容，原则上给出报告的大纲。

> 记住开始报告时要说的几句话，一般报告开始时会显得比较尴尬，准确知道你要说的话可以缓解开始时的紧张。

- **数据陈述**。将以前数据的幻灯片进行整理，确保数据陈述的逻辑性，即使实验做得没有逻辑，还是要有逻辑地陈述，一项接一项，一点接一点地详细解释每一张幻灯片，清楚地陈述所展示的每一张幻灯片。

  把数据划分成不同的标题，按标题分别进行讨论，每个标题应连贯自如。如果你的数据不多，还是应该将数据分成不同的标题，3 个或 4 个标题比较合适。在进入下一个标题前应重复一下刚才所讲内容的题目，完美的过渡对于完成高质量的报告至关重要。在每个标题之间，你应该建立一个逻辑上的联系桥梁。

> 在正式研讨会上会有一位幻灯片放映员或者你的同伴帮你播放幻灯片。当幻灯片需要切换的时候只需要对他说：“请放下一张。”等研讨会完成后再感谢播放员。

> 不要读你的报告，使用你的幻灯片作为线索来提示你。

  整个报告过程应该保持情绪高涨，**不要否定**自己的数据。讨论问题应该诚实可

信，但不要海阔天空，不要打自己的头。如果有可能，应该在进行数据解释的时候解决疑难问题，针对一些问题提出你自己将要进行的实验。

逐步总结你的数据，但要简明。在一张幻灯片上列出你的结论，照着幻灯片读就可以。

不断提醒听众实验数据的意义，为什么你做这些实验？你还要做些什么？

在报告结束时给出致谢通常是最舒服的事，习惯上把对课题研究做出贡献的人列在一张幻灯片上以示鸣谢，并用一句话来总结每个人的贡献，也可以展现一组或一张每个人与你讨论的照片。不要担心感谢那么多人会抹去你的荣耀，永远不会，感谢每一个帮助过你的人，包括那些帮你准备幻灯片的人。

不要吊听众胃口。结束时应该给听众这样的感觉，世上没有不散的宴席。

如果你没有把致谢写在幻灯片上，必须口头感谢那些对课题做出过贡献的人。

- **回答问题**。如果没有会议主席感谢你或者要求大家提问，你可以感谢听众，然后请他们提问。没有必要什么都讲，如果有些数据没有准备进行讨论，可以直说。如果你不知道答案，等问题问完之后可以直接告诉他。注意听完问题，学会用“你的意思是……”或者“让我重复一下你的问题”等句子来阐明别人提出的问题。尊重每个提问的人，避免发生争执。如果有人喜欢和你争辩，应该明智谨慎地解决这一尴尬的形势，可以建议他报告结束后再进行讨论。

控制报告会

你不仅应该控制自己的数据，还应该控制好报告会现场。

1. **声音**。要求带在脖颈上的或者可以用夹子夹住的话筒，不要用一直固定着的麦克风。
2. **站立的位置**。选择好站的地方，移动以集中听众的注意力。
3. **讲台**。将笔记放在讲台上，离开讲台，不要一直站在同一个地方。
4. **灯光**。不要熄灭房间里所有的灯光，找找讲台上是否有灯以便短暂的使用。
5. **房间**。鼓励听众靠近你坐。
6. **视觉教具**。不要让你的视觉教具太显眼，应让自己成为焦点。
7. **带上备份**。如果带了自己的投影仪，要记得带灯泡和指示笔。
8. 清楚报告的**时间**。如果报告要超出计划的时间，尽可能保证在规定时间内完成报告，包括删减一些内容。
9. **做好各种准备**。早点到达会场测试设备，包括灯光、指示笔和幻灯片。

10 分钟报告

许多会议上的报告只允许 10 分钟。艺术性地安排一个好的 10 分钟报告，短的报告比长时间的报告更难组织。报告中你不能讲述你的所有研究，因此必须只能选择其中的 1～2 点进行介绍，仔细选择你陈述的数据，像珍惜宝石一样珍惜小报告。

精确分配 1～2 分钟时间介绍前言，应该简明扼要，它为理解数据打下基础。尽量

仅使用 1～2 张幻灯片，尤其是数据。

直接进入数据陈述，用 3～6 张幻灯片，详尽描述每一张幻灯片，过渡的话题用口语，不要使用幻灯片。

结语幻灯片能帮助清晰整个报告的中心，总结你的数据，避免对前景和未来计划作过多的描述。

报告结束后有一段提问和回答时间，因为时间关系，只能允许有 2～3 个问题，可以用准备好的一些报告中没有播放的幻灯片来回答这些问题。

与你的主管研究人的会议

你最重要的会议是与你项目的主管研究人进行的一对一的谈话。但主管研究人们最主要的悲哀是缺少他们最想做的事——与实验室人员谈科学的时间。你必须尽最大努力安排好谈话，并确保谈话会议明晰和有效。

如果主管研究人保持开放政策，可以自由进行讨论，在你数据不坚实的前提下确保你能进行常规终止。如果主管研究人难以碰到，不管有多简短，尝试安排规律性的会议。主管研究人可能不希望有时间表，如果这样的话，不要按个人习惯去做，可以在正常间隔时间请求会议。表达清楚你希望会议简短、重点和已准备好了。

对陈述的内容做一个关于实验的简单前言，可以简单到像“如我们四月会议决定的，显示信号来源是优先主要的，为了这样做，我建立了这一实验来……”。如果你所在的实验室很大，你可能需要用更多一些有关项目的句子让主管研究人了解你。

清楚标记每个图表和每个样品，即使实验不能马上发表。主管研究人考虑最多的是同时有多个项目和基金，也许不能立即抓住你陈述内容的重要性，所以谈话尽可能简单。

说出你的结论，请求主管研究人投入或建议。在这儿你是同事，主管研究人应该是你有价值的资源。简单说明你下一步要做什么？为什么？

会议后续行为。在你做了你们讨论的事的时候，告知主管研究人或给他发个电子邮件，如果这样做更好的话。不要尝试组织一次会议解决所有的实验结果，只是找到一种与主管研究人保持联系的不唐突的途径，让他知道项目并对项目产生兴趣，成为专业。

期刊俱乐部

人们倾向于认为期刊俱乐部的报告既浪费时间又与自己的研究关系不大（当然，这是最重要的）。这是错误的认识，首先，可以通过期刊俱乐部学习很多东西，更重要的是可以补充一些常用的科学知识，可以给自己的研究带来一些启示。如果你没有准备好报告的内容，无法解释一些图表，对于研究工作的背景一无所知，这样很容易让人想到你工作做得很糟糕。但如果是简明扼要报告的话，会让人觉得一切都在你的控制之下。

> 在参加期刊俱乐部前总能阅读论文，如果论文没有张贴或发送，可以向陈述人索要论文题目或自己设法获得。预先阅读论文能极大提高你的理解，帮助你成为参与者而不仅仅是听众。

- **形式**。通常有两种形式的期刊俱乐部，一种是非常简短的5或6篇现行的但不相关论文的综述，或者是对同一研究的1或2篇论文进行深层次综述。参加期刊俱乐部只需旁听，第一次参加记笔记并跟上报告就行。

  陈述人可能被希望在期刊俱乐部的一周或几天前分发文章或张贴出来。即使没有被期望这样做，还是应该这样做。文章的PDF格式可以通过网络下载或e-mail发送以节约纸张。

  最好少使用分发的印刷品，一篇分发的印刷品好处是将数据以标签的方式处理以使得人们容易理解和讨论数据。但是通常情况下，使用PowerPoint文件陈述你的数据，仅在被用于更好地展示数据。



图6-2　确信在报告会开始前你会使用灯和指示笔

- **报告的长度**。第一号准则——不要超过时间。杂志俱乐部通常是在一天的午饭时间或一天的最后时间举行，时间非常紧，实验正在进行，而且很多人已经陆续离开了，所以报告要尽量地简短，还要引起人们的兴趣。

选择期刊会议的题目

一些系希望会议上发言的人选择与自己研究方向接近的题目，而有些系则希望每个人选择不同的题目，满足学习知识的渴望。

一般地，选择一些院系老师可能会感兴趣的题目。虽然所有的科学都是相关的，但是也应该有针对性地选题。不应在一名植物学家面前讲述动物生理方面的研究。

最好把知道的和不知道的结合到一起，选择一个你不是完全不熟悉的题目，这样在演讲的时候不会感到吃力，而且不用阅读太多的背景知识。引用的文章最好都和自己的研究相关，不要引用自己不太了解的文章，除非这些文章写得实在太吸引人、内容具有争议而且重要。通过期刊会议你会发现，这是一个自己学习和在别人面前展示自己的机会。

引用新近发表的文章，最好是最近一个月的，除非文章对课题组特别重要，而且是一篇好文章。

引用权威的论文，虽然你会指明自己引用文章的出处，但是有诸多问题的文章会让别人对你的报告提出质疑。发表在*Nature*、*Science*或者*Cell*上的文章的确是好文章。从著名杂志选择文章确实减少了期刊俱乐部的焦虑和自卫，会使听众觉得花时间听是一种好的投资。

选用简单的文章，如果原因过于复杂，你会失去听众，除非你有特别的礼物去激励听众的注意力。最好挑那些你自己看得懂的文章。

选用有趣的文章，不要选用仅仅加大知识量的文章，比如，不应该选用诸如15种因素对一种蛋白质作用的文章，这种文章没有意义，而且让别人受益不大（也许具有帮助，但是他们也不会喜欢）。最好选用那些讨论机制的文章更容易引起别人的兴趣。

你可能与其他人共同进行一次期刊俱乐部活动，也可能单独进行报告。如果你和别人共享一段时间，这时需要你更加精确。期刊俱乐部的时间通常为15～30分钟，如果是一个人报告，30分钟是标准时间。有些实验室允许有1小时的深层报告。

- **报告的组织。**介绍论文题目、作者、主题，给出论文的背景，占总时间的10%～20%。介绍你的论文，清楚地说明题目的背景，选题的重要性和有趣的地方以及你为什么选择该文章。

  解释数据，占总时间的50%～80%，如果必要的话，介绍一下不平常的方法，给作者一个结论。

  指出数据、论文本身或者结论中存在的不足之处，数据是否可以保证得出作者的结论？很快地总结一下论文的结论和重要性。

  报告的前一个星期选择好论文，计划花整整两个晚上的时间准备你的第一次期刊俱乐部活动，阅读论文时，预测一下问题，这样你就可以有重点地报告论文。

> 了解论文的背景，至少阅读你所选择的论文参考文献中的三篇。你必须了解这篇论文的实验，你也必须了解这篇论文的结论是否存在争议，为什么存在争议。你也必须理解实验是怎么完成的，以及采用的实验方法是什么。

表述工具

除非你是作一个5分钟的报告，否则就需要一些可视化的工具来吸引人们的注意力。使用可视化的工具旨在提高你报告的质量，使用流程图可以很好的说明你实验的逻辑和步骤，使用图片可以使枯燥的文字变得更加生动，给人留下更加深刻的印象。当然，在整个报告过程中，你始终是主导报告的决定力量。

几乎目前所有报告会的演示都使用PowerPoint演示文件，计算机幻灯片放映使用的演示程序已变得越来越常用。这些程序允许生成你陈述的数据并已经实现了用户化。即使在过程中你也可以修改你的陈述内容。但是应该压制添加汽笛声和铃声的欲望，以确保图表合乎文字简单化，放映幻灯片时也遵循同样的规则。

“粉笔演讲”依赖于最小的可视化工具，因为其中只需要用到一块白板或黑板。一些可以确定的数据可以在期刊俱乐部开始前画在白板或黑板上，这种情况下，板就像头顶上的放映机。

但是，黑板最好的使用方式是在报告过程中快速地写或画上你所报告的内容——真正的粉笔讲演，不仅能为评论性的听众展示你数据的重点还能组织好和突出重点，是一种科学技能，值得训练。

投影仪是展示数据以及吸引注意力很好的帮手，你可以从论文中剪下重要的图片，用投影仪播放这些图片，也可以自己绘制一些图片以及一些结论性的东西，用投影仪播放。在报告过程中，可以通过在幻灯片中的绘图来表达你的意思。

请使用大字体和黑体，因为小字体不容易看清楚。如果你写的字不够清晰，那就使用至少14号的字体打印。把幻灯片按照你要播放的顺序放好，每张之间用纸隔开。

你需要使用塑料片来制作投影片，投影片是特殊的，它们要适合在复印机上使用，

在办公室或文具用品店找到你需要的投影片，如果你要在上面画上你全部图表，使用任何透明塑料纸都是可以的。

说话要大声响亮，你的声音要盖过投影仪的噪声，不要站在投影出来的图片前。

影印机与投影仪一样被使用，尽量减少影印的数量，不要忘记和你的听众交流。因为你的眼睛过多地集中在文字上，经常忘记和听众眼睛的交流。你也可复制整篇论文分发到听众手里，不过这通常是徒劳的。

字体文件

对于手稿使用有效的字体对幻灯片没有必要。

衬线对无衬线字体。字体被分为衬线（带十字划线）和无衬线（不带十字划线）。一般认为，衬线字体可以使得单字更为明显和更易快速阅读，常被选用于手稿。很多研究人员对于幻灯片更倾向于选择更为简单的无衬线字体（手稿的标题）。

衬线字体：Times，Times Roman

无衬线字体：Arial，Helvetica，Verdana，Genera

固定宽度对可变宽度字体。固定宽度字体对于每个字符使用相同的空间，可变宽度字体则不是。固定宽度字体（继承于打字机）对表格适用，而看上去更自然的可变宽度字体对于幻灯片更为适合。

固定宽度字体：Courier，Times New Roman

可变宽度字体：Arial

幻灯片是正式报告的心脏和支柱。

- 在你报告的前一个星期完成你的幻灯片，这样有充分的时间增加新内容，检查在教室的最后是不是也能清楚地看到你的幻灯片，重做不能使用的部分。
- 文字最小也要20号，检查所有的幻灯片在房间的最后面是否能够看清楚。
- 每一张幻灯片说明一个问题，不要把很多内容混到一张幻灯片里面。
- 图片要有标号，这样听众就可以很清楚地理解图片而不需要更多地解释。和手稿中的表格和图片不同，报告中的表格和图片需要标号以及概括性的说明。
- 找一个和你要作报告房间类似的房间，把投影片投影到屏幕上，仔细查看你的投影片。有很多幻灯片在纸上的时候看起来很好，但是投影以后效果就不好了。

幻灯片的种类

- 文字介绍的幻灯片。
- 背景知识幻灯片，可以从其他研究人员那里借来，也可以根据书本和文献制作。
- 数据幻灯片。
- 在报告的每一个部分都有一句话的文字幻灯片。
- 文字总结或结论性幻灯片。
- 致谢幻灯片。报告的结尾，不仅要感谢那些在技术和理论上帮助你的人，还要感谢包括幻灯片的准备、计算机图形学以及那些提供帮助材料的人。

- 对一场45～60分钟的报告来讲，20～40张幻灯片是比较合适的。全部是数据的幻灯片不要超过20张。如果你的幻灯片数目超过20张，这些幻灯片应该包括图片、绘图、模型和文字幻灯片。

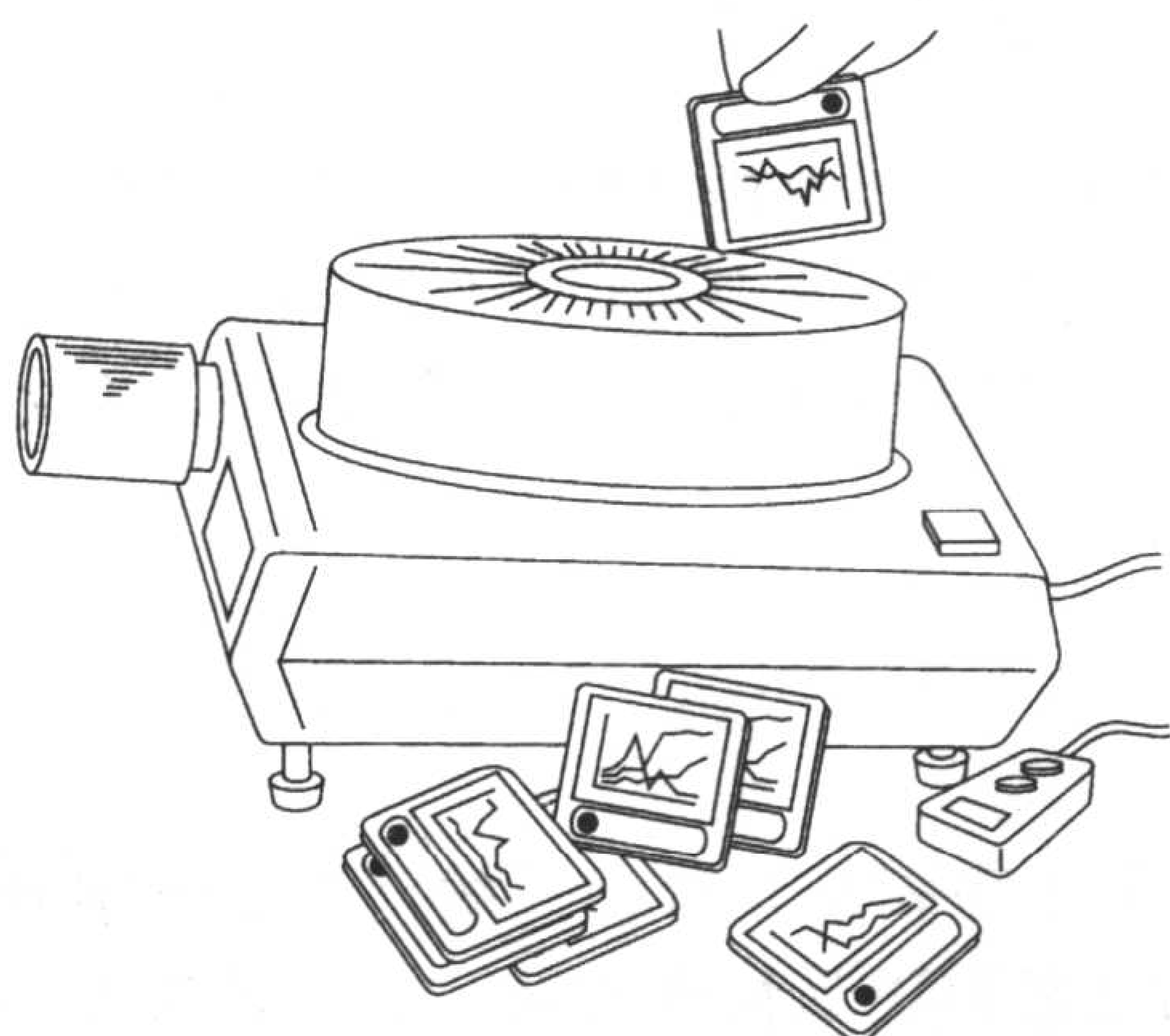


图6-3　幻灯片

在每张幻灯片的左下方标记上一个圆点，幻灯片摆放时的方向为上边朝下放，将圆点的位置保持在右上方。在报告会前将幻灯片放置好并检查幻灯片的次序和放置。

很多单位使用35mm的幻灯片，图表可以采用画、拍摄、冲印的形式或在单位的媒体中心制作成幻灯片。PowerPoint幻灯片有时也被制作成35mm的幻灯片，因为在大报告厅35mm幻灯片经投影后的分辨效果要比PowerPoint演示效果要好。一些单位有宝丽莱照相机，可以在30分钟内完成幻灯片的制作。这些照相机通常使用的是黑白胶片，比图画合适。如果这是你的惟一选择，那么学会使用照相机。

PowerPoint的提示、技巧和警告

演示程序比你的研究报告有更多的选择，但应拒绝添加所有汽笛声和铃声，保证图表和文字简单。

- *活泼*　偶尔的活泼可能有效——只是非常偶然的活泼。同样，仅仅只能使用非常偶然的声音。
- *前进式幻灯片*　使用键盘箭头或无线遥控器，计时的幻灯片看上去特别像一场电视汇映，使得陈述人成为陈述机器，按照设置的节奏进行。
- *备份*　在你动身去作报告前，检查并确定选择的储存文件格式，应对你的报告文件选择另外一个格式备份。如果在出发前你已完成报告文件，应该将报告文件通过电子邮件发到对方单位。
- *分发的印刷品*　你可以将幻灯片打印，这不仅对你的听众有用，对准备和进行你的报告也有用。
- *隐匿幻灯片*　你可能在准备好的完整报告中有一些不想包含进去的数据，但想在回答听众问题时使用，使用"隐匿幻灯片"，即选择在幻灯片分类中做成可见的幻灯片，但不要做进报告幻灯片中去。
- *备注*　备注选择允许你在每一张幻灯片中增加、显示和打印注释内容，这些电子索引卡在审查你的报告中没有价值，但使你能有计划地口头表述幻灯片的转换和重要点。
- *拼写*　幻灯片上的排字或拼写错误出现，说明草率。在你制作或当你完成幻灯片后，通过拼写检查功能来避免这样的错误。
- *转换*　研究报告在幻灯片之间的转换不需要效果。影像分割成幻灯片、通过黑色消失或西洋跳棋盘褪去都会发疯似的夺走你的数据。

科学论文写作

论文原稿

不谈政治，涉及科技论文出版的策略是非常复杂的。有许多书关于这个主题，向科学家们给出了实用性的建议。

一般技巧

- 从开始的时候，就像论文数据那样思考你的实验。是的，这听起来似乎有代替科学兴趣的野心，但你必须发表论文，在你思考出版的时候，可以防止你深深陷入死胡同，这总是可以帮助你获得正确的控制。
- 使你的论文基于数据而不是其他，在写论文以前准备好你的图表。
- 在你讲故事前确保你的数据是可以重复的。
- 尽可能快地写完你的论文，在准备好前就开始写论文。可能不会有一个最好的答案，但你必须给出一个结局，如果需要更多的东西，你在写作过程中自然就会清楚。
- 在换项目或换实验室以前写完所有的论文，没有人可以一仆二主。项目的结束是一件让人失意的事情，在开始新的项目以前你必须完成所有的论文。
- 检查拼写和语法，拼写错误会让读者失去对你的信任。
- 你的参考文献要具有选择性和完整性，在论文的最后版本中，参考文献必须排列正确，在使用排版软件的时候，参考文献经常会变得杂乱。
- 在论文交给主要研究人阅读前你至少要找三位读者来阅读你的论文。两位熟悉这个领域的读者，他们会指出你存在的疏忽之处和给出建议等等。一位不一定熟悉这个领域的人，他可以帮助你找出论文中的逻辑、拼写和语法错误。每次论文的修改稿都要这样做，尽量寻找相同的读者，不要找过多的读者，他们可能会给出互相冲突的意见，但是你必须寻找那些能力强的读者，他们思考问题更全面，敢于发表意见，同时又非常真诚。
- 在选择期刊投稿时，先要根据你论文的质量。如果你的选择就是你的决定，问问主要研究人有什么建议，杂志社倾向于录用来自同样实验室的论文，主要研究人应该知道实验室以前的投稿情况。
- 不要因为有反面意见而灰心，许多评阅意见都是可以争论的，无论怎样都要去争取，实际上很多论文就是在不断的讨论中改进的。

> 如果有人邀请你帮他阅读论文和提出意见，你要尽可能快地去做，只有最快的反馈才是有用的，如果你不能在几天以内阅读完他的论文，在你拿走论文手稿前就告诉他。

> 当主要研究人拿到你论文的时候，论文应基本是出版格式，修正语法和拼写错误不是主要研究人的责任。

> 当你向杂志投稿时，应该给主编发一份关于你论文的介绍。

当写论文手稿审稿意见时

批判性的；提示；不要华而不实；不要心胸狭窄

研究的定义

多年来，实验室一直滥用对研究的定义，这对于他们很痛苦，很多习惯用语应该避免。

“很久以前我们就知道……”，我没有去找原始的参考文献。

“有重要理论意义和现实意义”，我有兴趣。

“虽然对这些问题不太可能给出明确的答案……”，实验没有成功，但是我还是可以公开发表。

“非常纯净，超纯”，组成不知道，除非夸大其辞。

“从样本中选择了三个作详细研究”，其他的结果没有意义，被忽略了。

“实验中意外污染了”，意外打翻在地上了。

“实验中非常小心操作”，没有打翻在地上。

“典型的数据被给出”，显示的是最好的数据。

“推测要更长时间”，我没有花时间去找。

“这些结果将在以后的数据中报告”，以后有空再会考虑这些。

“最有价值的数据是琼斯的数据”，他是我的学生。

“我确信……”，我想。

“普遍认为……”，还有一些其他人也这么认为。

“可能争议的是……”，我对这个问题有一个很好的答案，我现在就提出来。

“很明显，如果对这个问题要有清楚地理解，还要做很多额外的工作”，我还是不太理解这个问题。

“在一定的数量内修改”，错误。

“希望这一工作将促进本领域的进一步研究”，这篇论文不是很完善，但是这个领域的其他论文也不怎么样。

“感谢 Joe Glotz 为实验作出的帮助和感谢 John Doe 富有意义的讨论”，Glotz 做的工作，Doe 给我作解释。

项目基金申请

项目基金申请比手稿书写要复杂得多，因为你不但要让读者明白你工作的重要性，还要让他们相信你能完成这项工作，获得资助是和政府分不开的。

提交申请的政治性和实用性

- 了解全国卫生研究所和其他基金代理处办公室的办事程序。他们工作的一部分是为了帮助你，可以指导你申请最合适的研究领域和建议你重新投递基金申请，通常还会将期望和过程说得更清楚。
- 与单位的基金办公室保持密切联系，这些基金办公室的办事方式和职权范围各不相同，有些办公室就是给申请签名而不做其他事情，其他一些办公室不但关注科技，而且关注管理和经费，甚至会提出意见。切记基金申请的最后期限，基金办公室会

受理你的申请，但是你必须给他们足够的时间为你提供帮助。把申请书拷贝到磁盘上，可以在基金办公室找到磁盘，或者在代理处可以找到。

很多代理整年都在特定的领域申请基金，这通常会有比较高的申请成功率。

- 通过尽可能多的代理申请同一基金听起来是合理的，但不要忘记每个代理申请基金需要花的时间，这至少需要一个星期。
- 申请基金的最好方法是在这个课题研究上已经发表了论文。
- 在申请基金之前，你必须已经有了初步的结果。当你在这个领域没有受过正式的训练，或者你要申请的是新领域或者申请的结果与现在结果矛盾时，这点尤其重要，先前的结果不必非属于你自己拥有。

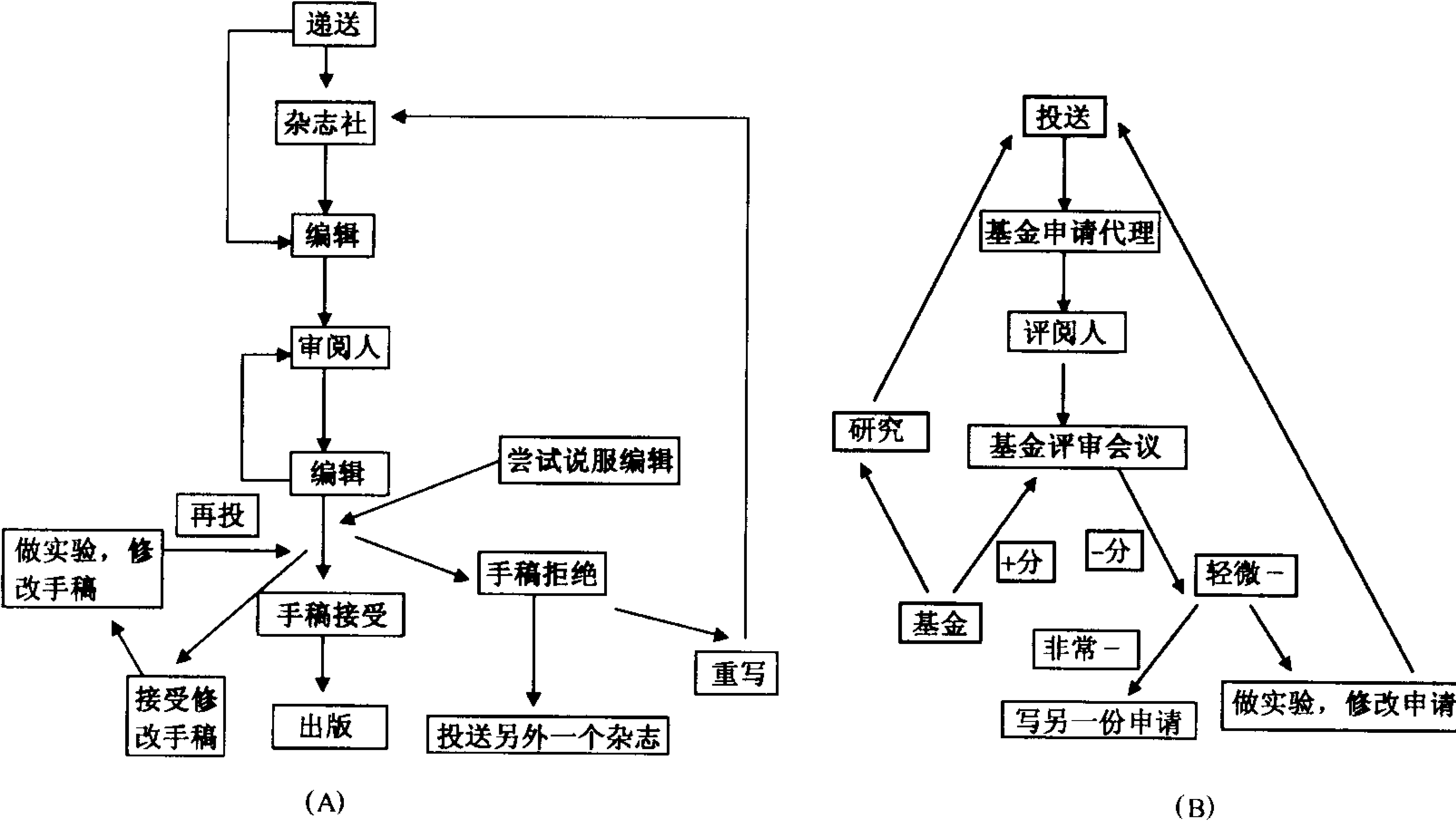


图 6-4　论文原稿和基金申请递交的次序

原稿投递（A）与基金申请递交（B）相似，不同的是原稿投递有更多的选择和机会。获得资助或发表论文需要3～6个月的时间。不是所有的基金申请和原稿投递都符合这样的程序，如有些编辑不把修改的手稿返回投稿人，只是接受或拒绝。修改的基金申请会送回给第一手呈递的人，有些代理则会接受或拒绝而不用说明等级或决定的理由。

- 很多代理同意在您申请之后评阅以前补充额外数据，只有那些很清晰，很有说服力的结果才能被添加到申请里面。
- 增加一些提供你经验的合作者，在申请资料里要提到这些合作者。大部分代理会要求你提供合作者的资料，同时也会要求你提供合作者写给你信的副本，以证明你们的合作关系。
- 至少找三位读者阅读修改你的申请，然后再找人重新阅读。

避免红色的标记，评阅人看到红色的标记就像公牛看到舞动的红旗。任何的疏忽都会大大影响评阅人的心情，这些疏忽包括拼写错误、参考文献编号的错误、图片编号错误等。

（洪　洁　王维荣　黄伟达）

参考文献

Alley M. 1996. *The craft of scientific writing*, 3rd edition. Springer, New York.

——. 2002. *The craft of scientific presentations: Critical steps to succeed and critical errors to avoid.* Springer Verlag, New York.

Bardwick J.M. 1995. *Danger in the comfort zone.* American Management Association, New York.

Barker K. 2002. *At the helm: A laboratory navigator.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Barnes G.A. 1982. *Communication skills for the foreign-born professional.* ISI Press, Philadelphia.

Carter S.P. 1987. *Writing for your peers. The primary journal paper.* Praeger, New York.

Covey S.R. and Merrill A.R. 2001. *First things first: Coping with the ever-increasing demands of the workplace.* Simon and Schuster, New York.

Davis M. 1997. *Scientific papers and presentations.* Academic Press, San Diego.

Day R.A. 1995. *Scientific english: A guide for scientists and other professionals*, 2nd edition. Oryx Press, Phoenix.

——. 1998. *How to write and publish a scientific paper*, 5th edition. Oryx Press, Phoenix.

Friedland A.J. and Folt C.L. 2000. *Writing successful science proposals.* Yale University Press, New Haven,.

Goleman D. 2000. *Working with emotional intelligence.* Bantam, New York.

Gosling P.J. 1999. *Scientist's guide to poster presentations*, Kluwer Academic Publishers, Boston.

Hamlin S. 1988. *How to talk so people listen.* Harper and Row, New York.

Mandell S. 1993. *Effective presentation skills. A practical guide for better speaking.* Crisp Publications, Menlo Park, California.

Matthews J.R., Bowen J.M., and Matthews R.W. 1996. *Successful scientific writing. A step-by-step guide for the biological and biomedical sciences.* Cambridge University Press, United Kingdom.

North T. 2001. *Fonts: How to choose between them.* iBoost Journal at http://search.ibook.com. http://www.iboost.com/build/design/articles/10036.htm

Rosenberg A.D. 1997. *Career busters. 22 Things people do to·mess up their careers and how to avoid them*, Chapter 2. McGraw-Hill, New York.

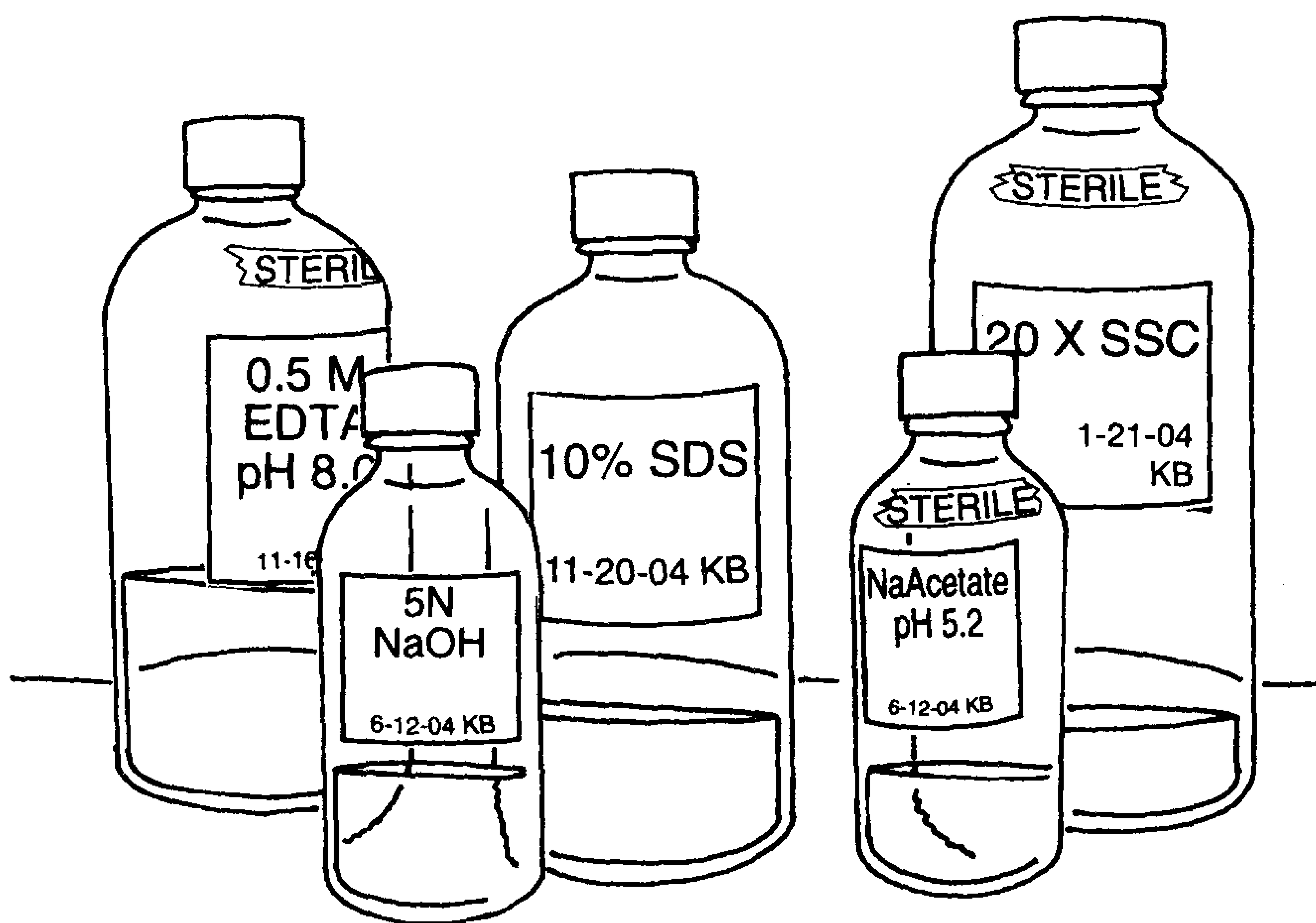
Strunk W., Jr. and White E.B. 1979. *The elements of style*, 3rd edition. Macmillan Publishing, New York.

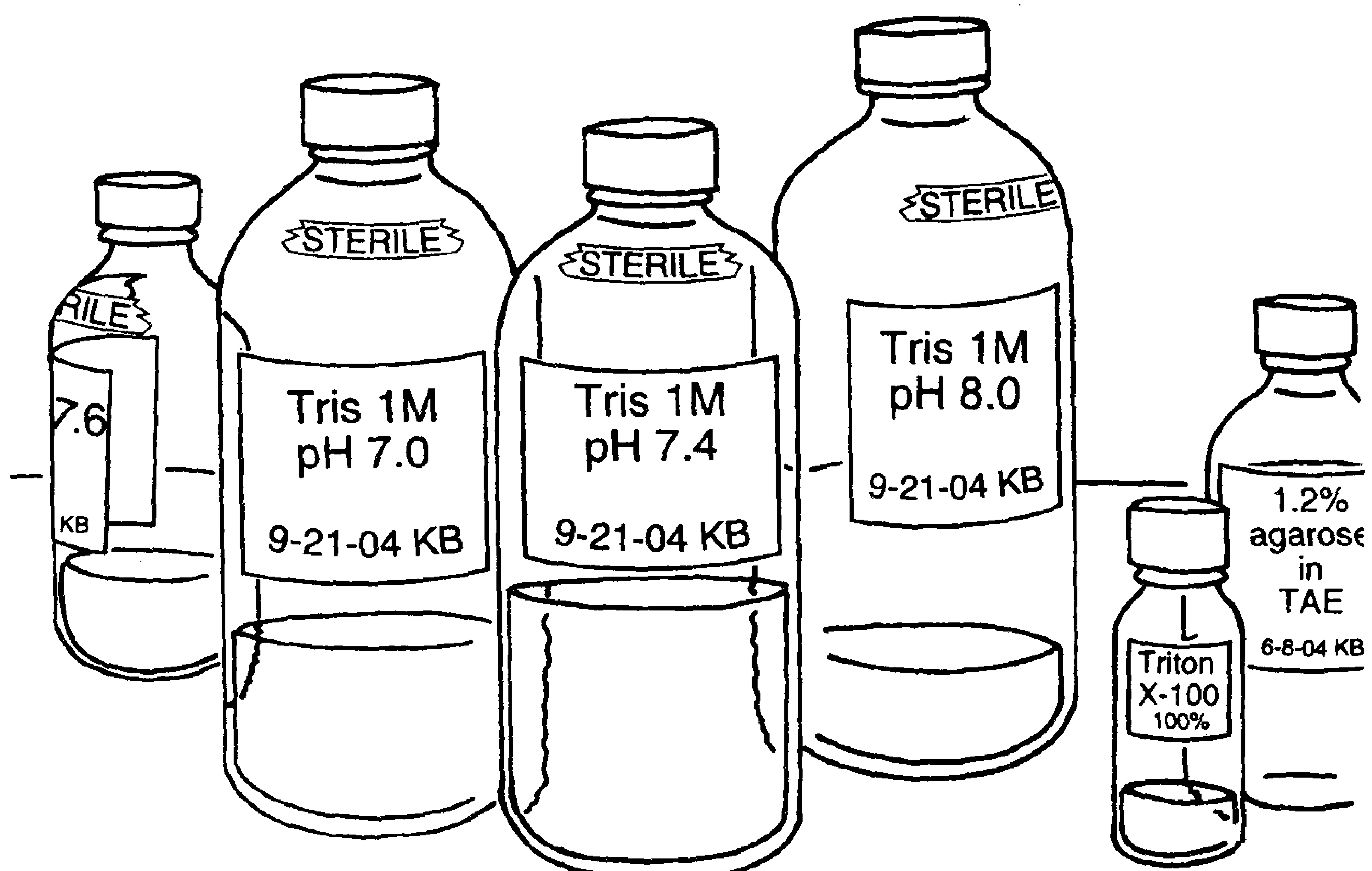
Tufte E.R. 1992. *The visual display of quantitative information*, Graphics Press, Cheshire, Connecticut.

——. 2003. *The cognitive style of PowerPoint*, September 2003, Graphics Press LLC, Cheshire, Connecticut.

Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication. November 2003. International Committee of Medical Journal Editors. http://www.icmje.org/index.html

第三篇　实验部分


STERILE
0.5 M
EDTA
pH 8.0
11-16
5N
NaOH
6-12-04 KB
STERILE
10% SDS
11-20-04 KB
STERILE
20 X SSC
1-21-04
KB
STERILE
NaAcetate
pH 5.2
6-12-04 KB


RILE
7.6
KB
STERILE
Tris 1M
pH 7.0
9-21-04 KB
STERILE
Tris 1M
pH 7.4
9-21-04 KB
STERILE
Tris 1M
pH 8.0
9-21-04 KB
1.2%
agarose
in
TAE
6-8-04 KB
Triton
X-100
100%

第 7 章　配制试剂和缓冲液

实验中花费的**大多数时间**不在实验本身，而在配制试剂、准备使用工具以及分析实验上。新手进入实验室的第一件事情通常是配制大量的缓冲液，让实验台的架子看上去不空荡荡，这样才能进行实验。配制缓冲液和试剂会在整个的实验过程中都要进行，你的实验将取决于你所配试剂的质量。

缓冲液是一种不易改变 pH 值的溶液，因为每个酶反应、每个细胞以及每一种物质的提取都需要有一个最佳的 pH 值，因此缓冲液消耗量很大。缓冲液的作用很多，清洗细胞、酶切 DNA 以及电泳都需要缓冲液。生物分子在缓冲液中可以保持其结构和活性的稳定。一些盐溶液，如氯化钠，不需要配成缓冲液，因为它们本身就是复杂缓冲液的成分之一。

确定所需之物

如果你在**任何一个实验室**做生物医学研究，不管是什么特殊的实验，都需要一些试剂，这些就是你第一次要配的试剂。在开始实验以前，你可以从实验室的其他成员处准确知道哪些是你应该配制的。所用的大多数的药品和试剂都会储存在实验室里，一些试剂已在第 3 章列了出来，常见试剂的配方将在本章列举。

通过阅读文献并与主要研究人及其他实验室成员讨论之后，你将会被给予一个或设计一个实验程序。在实验开始的前一天，应该确信所有实验需要的缓冲液和试剂已经配制好并灭菌待用，关于以下实验程序的具体细节，详见第 4 章。

永远按照实验程序操作!

1. **熟读整个实验程序，写下所有需要用到的试剂。**记下实验中所需试剂的名称、浓度(摩尔浓度或质量百分比浓度)、pH 值以及实验中需要用多少体积。
2. **确定每一种试剂你要配制多少。**如果你知道实验不会重复多次（不幸的是大多数实验都会重复多次)，最好配制合理的最少体积。如果实验程序上要求配制 10ml 1mol/L的 NaCl 溶液，应该在计划中配制 100ml，如果每次实验需要 1～50ml，为保证能正常地进行实验，一次应该配制 500ml～1L 溶液。如果材料太贵或者不稳定，最好现配现用。
3. **确定配制直接使用的溶液还是配制高浓度的储备液。**多数复杂的缓冲液都配制成 5、10、20 或者 50×的溶液，实验时再稀释。

> 例如，Tris/甘氨酸 SDS 缓冲液（Laemmli 电泳缓冲液)，通常用于蛋白质的凝胶电泳，常配成 **10×浓度**，因为工作浓度是 1×的 25mmol/L Tris、192mmol/L 甘氨酸和 0.1% SDS，10×的溶液就应该是 250mmol/L Tris、1.92mol/L 甘氨酸以及 1% SDS，实验时稀释 10 倍。

浓缩储备液的浓度极限是缓冲液中各组分的溶解能力。对于盐而言，如果浓度太高就很容易析出，在急需时可以加热或混合储备液解决，这并不是灾难，只是浪费时间而已。如果对配制储备液的浓度不清楚，可以询问实验室的其他人或者制造商，配制 5× 的储备液是安全的，高浓度的缓冲液一般在室温保存，以免发生沉淀。

其他通常高浓度储存的缓冲液有 PBS（10×）、SSC（10× 或 20×）和 TAE（10×）。许多公司供应配制好的缓冲液，它们有点贵，但使实验生活变得简单，问问实验室的习惯。

> 在配制储备液以前，应该用去离子水洗净 1～2 个瓶子，灭菌，用于储备缓冲液。

4. **确认你需要的化学试剂可以在实验室里找到。**如实验程序需要 1 mol/L NaCl 溶液，在你配置之前，应该检查一下实验室的 NaCl 是否有储备，没有的话是订购还是去借。一般来说，像 NaCl 这种实验室常见的药品应该是很常见和常用的。首先还是应该打开瓶子检查所装药品，有人可能把药品用得只剩下半克而没有预定（但是不会把药品用光，总会留一些在瓶子里）。
5. **如果没有库存应尽快获得药品。**与实验室订购药品的人员核实或与系采购部或公司联系是否已经订购替代品。如果有急用，NaCl 已经用完且新订购的药品要 3 天后才到，可以去其他实验室借用一些，并且答应一旦订购的药品来了就归还。

   最容易解决的办法就是向实验室的其他人要一些配好的储备液，研究人员一般都会在自己的架子上放上 5 mol/L 的 NaCl 储备液。在分子生物学实验中 NaCl 是许多复合缓冲液的成分之一，5 mol/L 的浓度很容易稀释到你所需要的浓度。计算好实验需要的最少量，然后再向别人借。你没有必要归还 20 ml 的溶液，大多数人都不会要一个实验室新手配制的溶液，但还是要跟别人说清楚自己会还。

安全性

在配制任何试剂或者缓冲液之前，都应该检查药品的标签上有没有危险标志，没有人会提醒你。有些药品的危险性是众所周知而且是上课时反复强调过的，如实验室里没有人会提醒你溴化乙锭是强致癌剂，也没有人会告诫你，在配制药品的时候你不能假定它是安全的就随意处理。

- **清楚你所接触的每一个药品的组分及相关毒性**

1. 查看药品安全数据表（MSDS）。药品安全数据表必须包括所有购买的药品，必须以文件夹的形式保存在实验室。它主要描述化学药品的组分和性质，而且列出了化学药品的毒性以及对有毒药品的处理方式。
2. 寻找有毒物质的分类标志。这些标志（经过运输部和国家防火协会介绍并通过职业安全和卫生条例管理局认证）将有毒物质分为健康危害、易燃、反应活性和有特殊危害等种类。
3. 仔细阅读瓶子上的警告。不是所有药品的瓶子上都有危害物质分类标志，但会有警告，有时印刷很小。
4. 如果没有看到警告，查询一下 Merck 索引。
5. 如果标志使用其他语言或找不到标志目录，询问供货商或者环境健康与安全部门办公室。

- **遵照建议处理**。遵照处理物质标贴上的告示操作。实验室应该有一份有害试剂分类及安全警告的清单，如果没有就请教环境健康与安全部门处。

1. **手套**。工作的时候一定要佩戴合适的手套，配制任何试剂时都应该戴乳胶腈或聚氯乙烯手套，这样可以保护双手不被一些粉末试剂伤害，但是这样的保护是不足够的，比如酚。对于有机溶剂需要耐化学腐蚀的橡胶或者氯丁（二烯）橡胶手套。如果你对乳胶手套过敏，可以询问环境健康与安全部门处。
2. **眼睛保护**。为了防止可能的液体飞溅、气雾剂、易燃物或者碎玻璃，应该佩戴塑料眼睛或者护目镜。
3. **橱罩**。挥发性物质的配制应该在化学通风橱中进行，确认其可以使用。

有些人对于制造乳胶手套所使用的物质过敏，这种过敏通常表现为慢性皮炎，时间越长越严重。如果你发现由于戴乳胶手套手上出现皮疹，应该停止使用乳胶手套。询问环境健康与安全部门处有没有其他手套代替。使用没有粉末的乳胶手套可能会防止乳胶过敏。

表 7-1 手套材料的比较

特性	乳胶 天然橡胶乳胶	乙烯树脂 聚氯乙烯 PVC	腈 丙烯腈和丁二烯	聚亚胺酯 聚亚胺酯
屏障保护	极好	一般到差	极好	极好
强度和耐用性	极好	差	极好	极好
弹性	极好	差	好	好
抗刺能力	好	差	好	好
化学防护	好	差	极好	极好
合适和舒适	极好	一般	好	极好
蛋白质过敏	决定于手套和制造商	无	无	无
价格	中低	中低	中高	中高

由 http://www.adenna.com/rc compare _ GloveMaterials.htm 同意引印。

本表比较了不同手套材料的特性和价格，可以作为参照，在决定哪种手套材料适合你特殊的任务时，按警告进行。

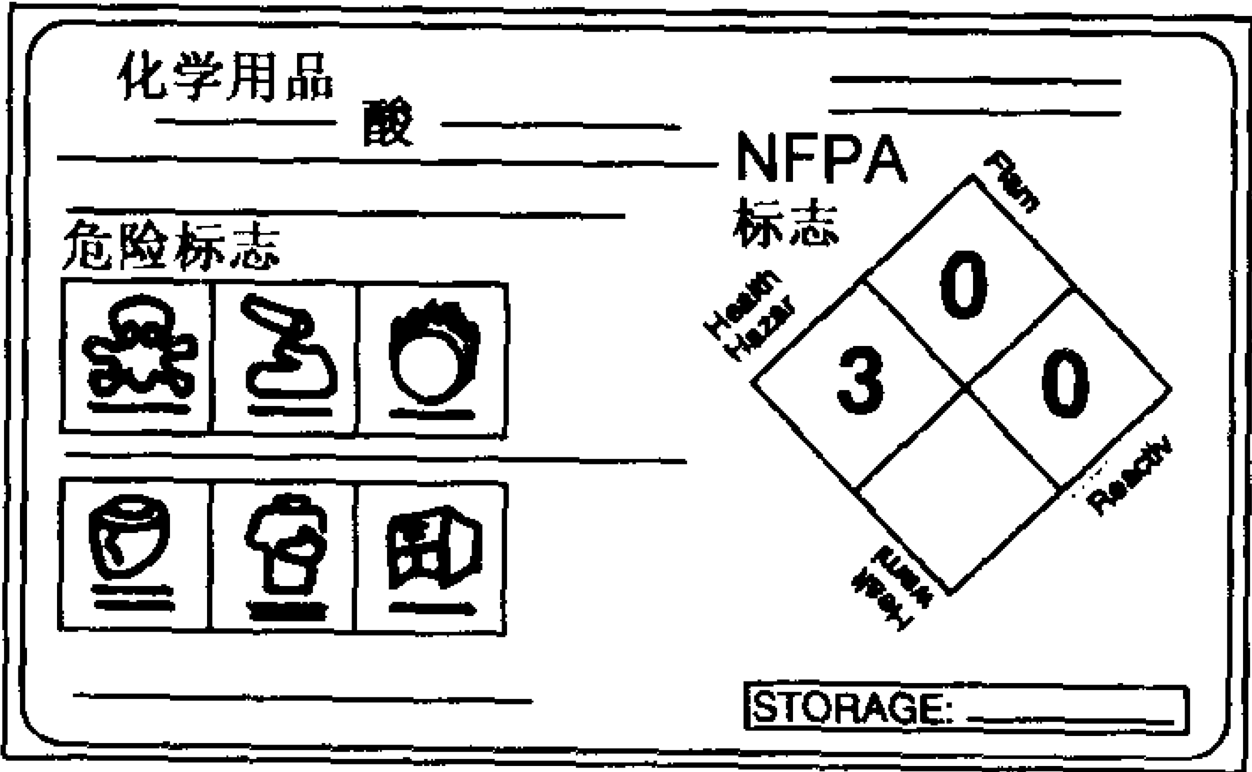


图 7-1 危害物质分类标签

特殊危害的列在左下方的表格中，反应性、健康和易燃危害用增加的数字来表示级别，0 表示没有危害，4 表示非常危害。

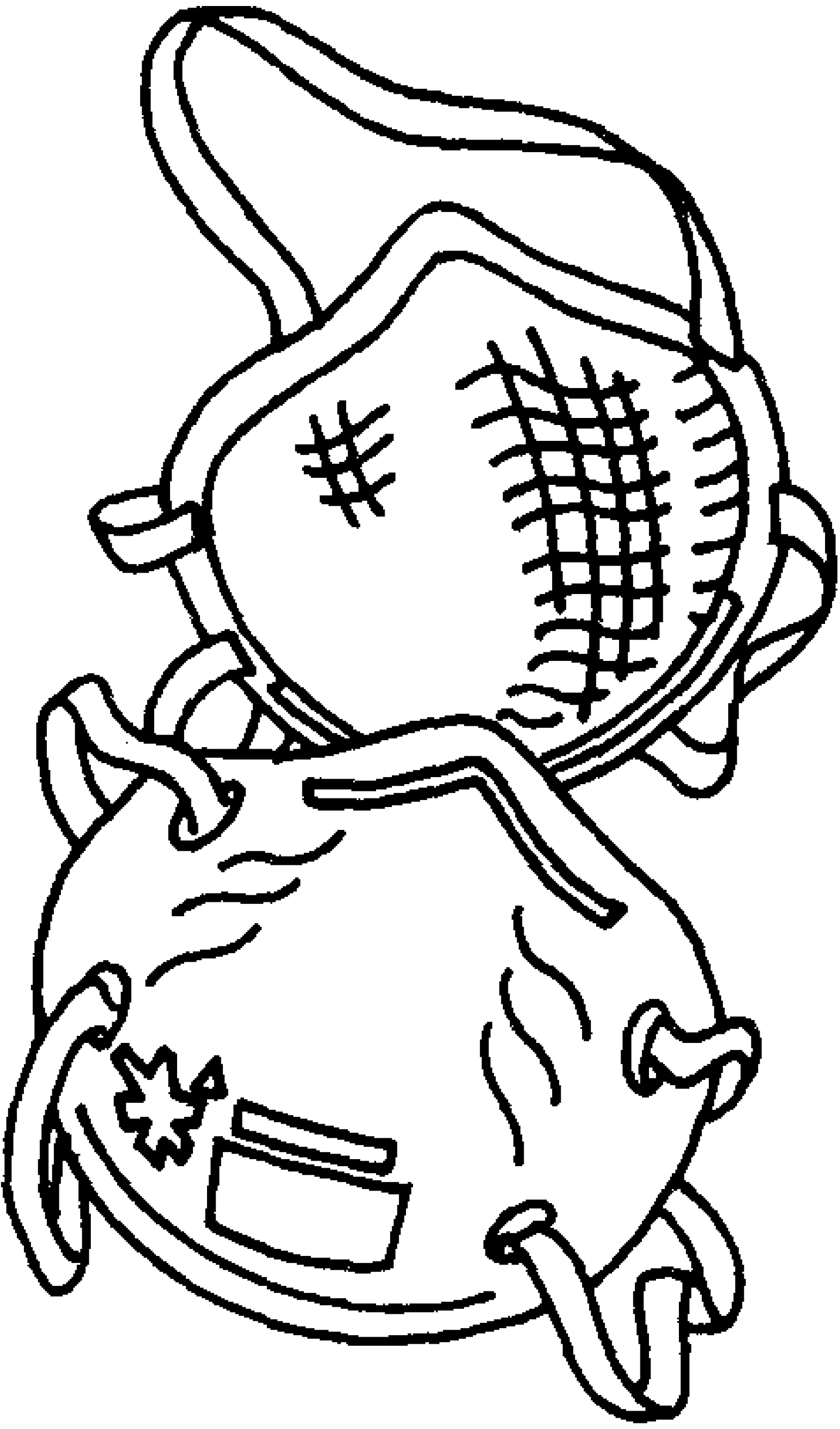


图 7-2 防尘防雾面罩

4. **面罩**。诸如 SDS 等一些粉末能够导致鼻腔受损，一个简单的防尘防雾面罩或者手术面罩可以保护你。但是另外一些物质，尤其是挥发性的物质，也许需要带呼吸器的面罩。不要掉以轻心，没有人会警告你。
5. **标签**。有害试剂配好以后应该在瓶子表面黏标签和标志，防止忘记，也方便别人使用你的试剂也不利。

有害试剂

以下一些常用试剂具有潜在的危害，处理时必须非常小心，要戴手套，仔细遵照警告操作。

丙烯酰胺。神经毒性，用于蛋白质电泳凝胶和测序凝胶的制备，要戴面罩。

溴化乙锭。EtBr 是一种诱变剂，能嵌入 DNA，用于核酸标记。有毒，固体可以刺激皮肤和黏膜。

酚。具有强腐蚀性，可以灼伤皮肤，萃取和配制酚时应使用通风橱。

苯甲基磺酰氟（PMSF）。分离蛋白质时用于对蛋白水解酶的抑制，吞咽或通过皮肤吸收都有可能致命。

十二烷基硫酸钠（SDS）。去垢剂，易燃，尤其对于鼻腔刺激性强，SDS 质地光滑蓬松，称量时要动作轻盈和戴面罩。

• **知道如何使用通风橱**

1. **打开通风橱**，确认在排气，你可以通过听和感觉知道它是在工作。通风橱旁边不能有空调和风扇工作，它们会影响橱内的空气环境。
2. **橱门应该比下巴低**，通风橱前面的橱门应该放得较低，低的程度由环境健康与安全部门处决定，橱门越低保护性越强，如果你在处理挥发性很强的试剂时，橱门应该放得非常低。
3. **至少离通风橱 6 英寸处工作**。
4. **保护好纸张和分量轻的物品**，它们可能被排气吹走。
5. **不要堵住通风橱后方的排气槽**或挡住金属嘴和工作表面之间的空间。

用什么水？

水是溶液中重要的成分，不仅是将物质溶解于其中，水的质量、组分以及 pH 值会极大地影响实验结果。多数人都知道由于换了水有的实验就无法进行。

假定溶剂是水，否则另当别论。

为了提高水的纯度，有几种水质分类的方法：

1. **自来水**。自来水的质量广泛不一，它的矿物组成和非纯物质的组分决定于水源的地理位置、运输管道或者是那个季节的降雨量。水中的一些矿物质可以抑制酶反应或者抑制细胞生长，至少自来水的诸多复杂因素对于实验都是非重复的变量，所以实验不能用自来水。自来水只能用于清洗玻璃器皿和其他实验设备。
2. **实验室级用水**。实验室级用水一般都经过反渗透或蒸馏预处理，适合于配制缓冲液。

3. 试剂级用水。 通过蒸馏或去离子，实验室级用水可以被进一步纯化，用于细胞培养液或者配制生化试剂以及缓冲液。

4. 超纯试剂级用水。 一些实验室对于水有特殊和严格的要求，例如，通过超滤的水被认为是无内毒素（内毒素是细菌细胞壁的成分）的，可以用于特殊的细胞培养。

蒸馏仍然是实验室最常见的用于水纯化的方法，试剂级用水一般再结合反渗透装置（水可以通过半透膜，但杂质不能通过）和去离子化（用阴、阳离子树脂去除水中的离子）获得。超滤、吸附、紫外辐射氧化等可以用于进一步地纯化用水。超纯试剂级用水还可以直接从研究所或医院等机构购买。

许多单位有“室内蒸馏水”，通过水槽边上的自来水管供应在中心蒸馏场所的蒸馏，这就是实验室级用水，可以用于配制缓冲液，但不能用于细胞培养以及酶反应缓冲液的配制。这种水更多地用于玻璃器皿的洗涤。

> 经常准备 1～2L 灭菌的试剂级用水，用于稀释储备的浓缩缓冲液。

如果试剂级用水足够多，用它来配制所有的缓冲液。

塑料和玻璃器皿

为了配制试剂，需要量筒、烧杯、容量瓶和三角烧瓶，这些都是实验室可重复使用的器具，为了防尘一般存放在密闭的柜子里。

有的实验室使用玻璃器皿，有的实验室使用塑料器皿，绝大多数实验室两种器皿都用。玻璃器皿干净，但清洗时容易打碎。塑料器皿耐用，但有些型号经过灭菌后容易变色，有些塑料量筒会因为灭菌而变形，在使用任何器皿之前都应该清楚它能否正常工作。

用于混合的玻璃器皿

烧杯　用于溶解固体，塑料或者玻璃器皿都可以。

三角烧瓶　溶解易产生气体的物质。

试管　用于 10 ml 以下的体积。

容量瓶　用于混匀两种液体，通过涡旋混合，不用搅拌棒。

不能使用玻璃器皿的混合

量筒　不能直接把固体的溶质直接放到量筒里，因为量筒太高，磁力搅拌器不能正常工作，而且溶解摇动量筒时，盖在量筒口的塑料薄膜很容易导致污染也会造成潜在的危险。

储存缓冲液的玻璃器皿

带线纹盖的玻璃瓶　适于储存多种溶液。

细胞培养液玻璃瓶　购买配好的培养基和缓冲液装在这些瓶子中，它们可以重复使用。

细口瓶　最适于储存缓冲液。

不适合用于缓冲液储存的器皿

广口瓶　所装液体容易污染。

> **琥珀色容器**　只存放对光敏感的试剂。
>
> **线纹盖子封口不严密**　污染会是严重的问题，封口不严密的瓶子一般用不久。任何有缺口、有裂痕或者受损的瓶子很容易在灭菌或者温度改变的时候破碎。

塑料器皿和玻璃器皿（有的时候指的都是玻璃器皿）在清洗后放到架子上前一般都要灭菌，处理好的器皿用铝箔纸包好表示灭过菌。

> 不要把玻璃器皿放在实验台上，如果一到下午量筒就用完，那么多订购一些。

对于试剂和缓冲液的储存可以选用不同颜色的瓶子，有些瓶子是专门用于储存缓冲液的，但大多数瓶子是可以重复利用的。

计算所需之物

操作步骤或配方上会有每一种溶液的物质的量浓度或者质量百分比浓度的描述。

摩尔浓度溶液

配制具有一定物质的量浓度的溶液，要知道所需体积以及计算物质相对分子质量的公式。

计算物质的分子质量

- 如果已知物质的名称，而不知道分子式，可以查询 Merck 公司目录或者化学辞典。
- 学会从元素周期表上计算物质的相对分子质量（MW）（例如，NaCl，Na 的原子量是 22.98，氯的原子量是 35.45，所以整个物质的相对分子质量为 58.43）。

> Merck 公司目录上还会提到物质的溶解性和稳定性。

- 获得分子质量最好的办法是从所装物质瓶子的标签得知，这样你可以确定这种物质是否是需要的。如果标签上的分子质量字迹模糊，核查产品目录或者打电话到公司技术部门询问。

仔细阅读标签确信你拿得到的物质正是你需要的，确信看到了分子式而不只是名称，因为缺少的可能是差异，但却决定了差异的后果。特别要核实：

盐或酸/碱的形式，使用盐对酸的主要问题是 pH 值的差异，例如常见的 Tris 缓冲液，或 Tris·HCl、Tris 碱，1 mol/L 的溶液可以配成不同 pH 值的 Tris 缓冲液。

无水或者有水，物质本身含水并不是什么问题，因为水也可以作为分子质量的一部分来进行计算。

计算物质的量浓度

> 你只需要一个计算，已知物质的摩尔质量等于 1 mol/L 未知物质的分子质量，
> 分子质量∶摩尔浓度＝X∶需要的摩尔浓度

例如：1L（1000 ml）1 mol/L NaCl

1摩尔（或1 mol/L）很简单，1 mol/L 等于1个摩尔数 NaCl 的摩尔质量，因为 NaCl 的分子质量是58.43，所以只需要在1 L 水中溶解58.43克 NaCl 就行，不用计算。

例如：1 L（1000 ml）5 mol/L NaCl

$58.43:1=X:5$

$58.43\times 5/1=292.15$ g

例如：300 ml 1 mol/L NaCl

如果你只需要300ml 1mol/L 的 NaCl，像减少水的体积一样按比例减少 NaCl 的质量，

$58.43:1000=X:300$，（1000 ml 水需要58.43 g NaCl，300 ml 需要多少克 NaCl），300乘以58.43，然后除以1000，答案是17.5 g，所以要配制300 ml 1 mol/L 的 NaCl，需要在300 ml 溶液中溶解17.5 g 的 NaCl。

例如：400 ml 0.25 mol/L 的 NaCl

针对不同体积和不同摩尔浓度，最简单的方法是进行多量计算对400 mL 0.25 mol/L 的 NaCl 最简单的计算方法是：

1. 先计算0.25 mol/L NaCl 的1 L 溶液需要多少克的 NaCl.

   $58.43:1000=X:250$

   $58.43\times 250=14607.5$，然后除以1000等于14.6。

   所以1000 ml　0.25 mol/L 的溶液，需要14.6 g NaCl。

2. 计算400 ml 0.25 mol/L NaCl 的溶液需要 NaCl 的量

   $14.6:1000=X:400$

   $400\times 14.6=5840$，5840除以400等于5.84.

   所以400 ml 0.25 mol/L 的 NaCl 溶液需要5.84 g NaCl。

   例如：10 L 5 mol/L 的 NaCl 溶液

1. 5mol/L 的1 L NaCl 溶液需要多少克 NaCl

   $58.43:1000=X:5000$

   $58.43\times 5000=292150$，除以1000为292.15

   1 L 5 mol/L 的 NaCl 溶液需要292.15g NaCl

2. 5 mol/L 的10 L NaCl 溶液需要多少克 NaCl

   $292.15:1=X:10$

   $292.15\times 10=2921.5$

> 在实验记录本上记好你的计算，即使是实验室的老手，在配制缓冲液时的计算也很容易出现这样的错误，如果记录详细的话，一旦实验出错，也容易去寻找错误。

计算方法是显而易见的，如计算10 L 5 mol/L 的 NaCl 溶液，只要用58.43×50就可以得到所需要称量的 NaCl 的质量，如果计算不熟练的话，最好还是按照公式去做。

当量（N）溶液

物质的量浓度是指1 L 溶液中溶质的摩尔质量，当量浓度的定义是1 L 水溶液中溶解的溶质的用氢的当量物除摩尔质量，物质的量浓度常用于表示碱和盐溶液的质量，当量浓度常用于表示酸溶液的质量。

这是什么意思呢？对于多数化学物质来说，物质的量浓度和当量浓度所表示的值相同，1 mol/L HCl 与1 N HCl 相同，但涉及到二价或者三价的物质（硫酸盐、磷酸盐和碳酸盐等）时，它们就具有不同的意义，如浓硫酸（H_2SO_4），每个硫酸分子

有 2 个当量的氢离子，硫酸的物质的量浓度是 18 mol/L，但当量浓度为 36 N。如果你将某物质的摩尔数相加，得到的量就相当于该物质的当量。

质量分数溶液

质量分数溶液是基于 100 ml（偶尔也可以是 100g）而言，几乎所有的质量分数溶液都用质量比体积（W/V）来计算，称量好的药品克数和毫升体积的水进行混合。

三种表示质量分数的方式

- 质量体积分数（W/V），每 100 ml 溶剂中溶解溶质的克数。一般来说，质量分数的溶液被认为是质量/体积（W/V），这也是公认的计算方法。
  例如：20%的 NaCl 溶液，在 70 ml 水中溶解 20 g NaCl，总体积定容至 100 ml。
- 体积分数（V/V），每 100 ml 溶液中溶质的体积数，通常用于稀释储备的浓缩液。
  例如：1%的 SDS 溶液，每个人的架子上都有 10%的 SDS 溶液（W/V），以 1:10 的比例将 10 ml 的 10% SDS 溶液加到 90 ml 水中，最终定容到 100 ml。
- 质量/质量分数（W/W），100 g 溶剂中溶解溶质的克数，这种表示方法从来不在配制标准缓冲液或者盐溶液中见到，但在配制梯度溶液时会用到。
  例如：10%（W/W）蔗糖溶液，称量 10 g 蔗糖，加入到 90 g 水中。理论上，水的毫升体积和质量相等，所以可以在烧杯里加入 90 ml 水代替称量。

稀释储备的缓冲液

稀释储备的缓冲液：

$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$

C_1 = 稀释前的浓度

V_1 = 稀释前的体积

C_2 = 稀释后的浓度

V_2 = 稀释后的体积

一旦实验，大多数缓冲液在用的时候只要将储备液进行稀释即可。

所有实验操作尽可能做得干净，如果不是用于培养细胞，没有必要用火焰烧瓶口。应该用灭菌的移液头，用完后立即盖上瓶盖。

稀释无菌缓冲液要采取无菌操作技术（第 9 章），仅用无菌移液头，用完后立即盖上所有瓶盖。

例：需要 100 ml1 mol/L 的 NaCl，有 5mol/L 的 NaCl 储备液：

$5 \times V_1 = 1 \times 100$

$V_1 = 20\text{ml}$

在 80 ml 的蒸馏水中加入 20ml 的 5mol/L 储备液，总体积为 100ml。或者使用无菌的 5 mol/L NaCl 和灭菌的去离子水，或者定容到 100ml 的溶液进行高压灭菌或者通过 0.2μm 的滤膜。

稀释的表示方法在不同的实验室有所不同，一般说，将 1 ml 浓溶液加入 9 ml 的稀释液被写成 1:10，这种符号容易引起混乱，因为 1 ml 浓溶液加到 1 ml 稀释液中可以表示为 1:1 或者 1:2，所以 1 ml 稀释到 10 ml 最好表示为 1/10 和 1:10。

连续稀释

连续稀释是降低溶液浓度最容易的方法，包括试剂、细菌或细胞样品、标准液或任何你希望提高或者降低其浓度来进行实验的溶液。

在考虑所需溶液的浓度时，在将溶液倒入容器中稀释时要考虑稀释倍数。

- **储备液。**储备液为高浓度溶液。
- **稀释因素。**稀释溶液之前，应该参考操作程序或者文献以决定你要稀释的倍数，1:10或者1:2稀释最普遍。连续稀释得到的最终溶液浓度，应该接近于所需溶液浓度。有时为了实验需要，也许应该扩大稀释倍数，1:10 或者 1:100。为了稀释到有效的特定浓度，1:2 的连续稀释可能更有用。
- **稀释培养基。**稀释在最终实验中实际用到的培养基或缓冲液，除非确实需要，否则稀释时不要用水或配制母液时所用的溶剂。

通常稀释用的溶剂不能不溶解溶质，或者溶解后对细胞培养或酶反应有害，物质的稀释应该稀释到无害的浓度。

- **体积。**稀释用到的体积和装溶液的管子大小决定于你需要的最终体积的溶液有多浓，如果最终浓度的溶液体积为 3 ml，不要用微型离心管稀释，同样，不要用 15 ml 的管子稀释体积为 1～2 ml 的溶液。
- **试管。**管口向上排放在试管架上，加入要稀释的介质，在每个管子上写上稀释的倍数和/或在实验记录本上写下所有的稀释，依次将试

从高到低地稀释试管中的液体浓度，一般比记算好的浓度高。不要用移液管稀释溶液。

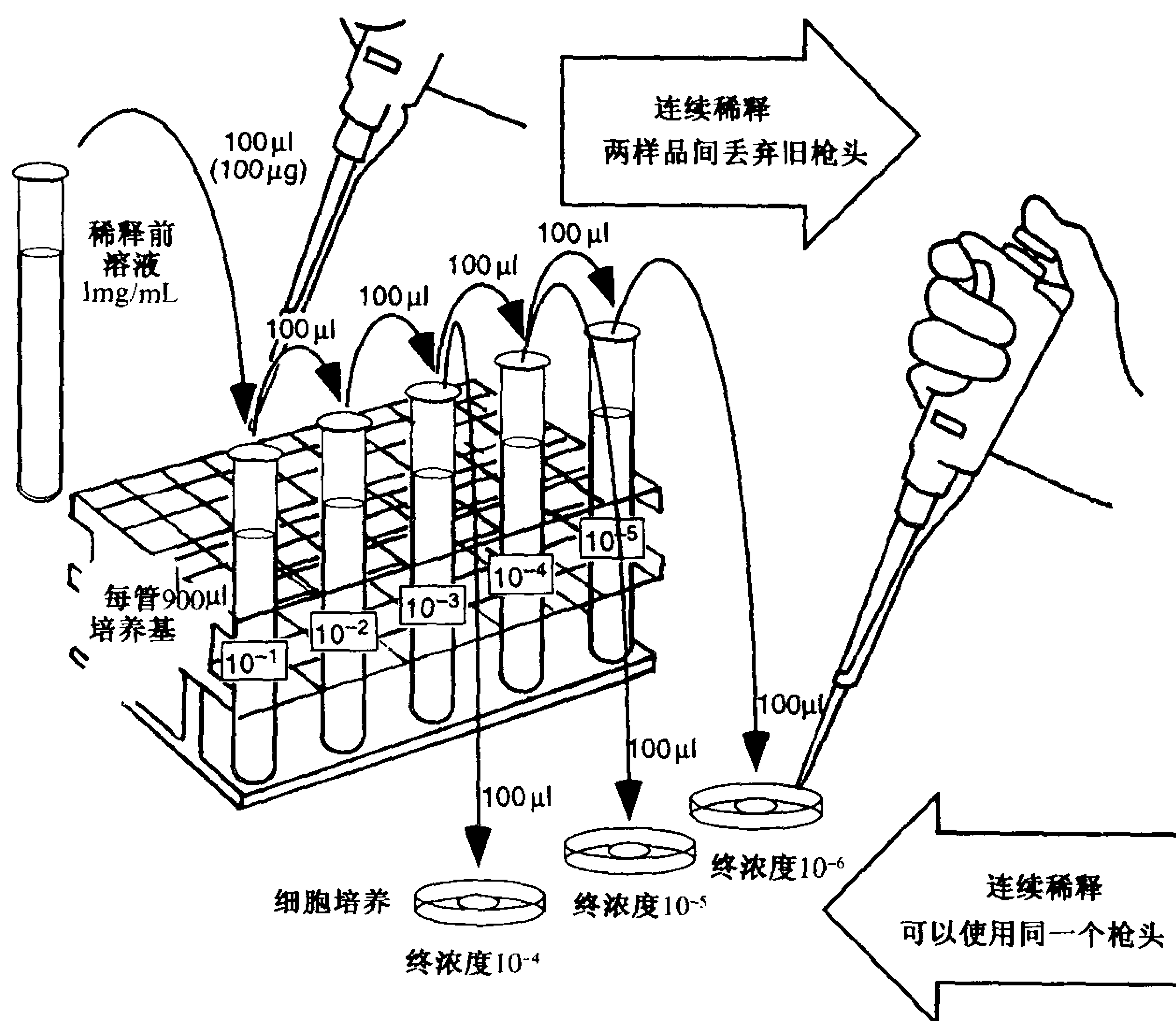


图 7-3 连续稀释 1mg/mL 的样品到终浓度分别为 100ng/mL、10ng/mL 和 1ng/mL

管放在架子上，加样时从左到右以达到依次降低浓度的目的。

- **移液管。**使用合适的移液管或移液器来转移相应体积的液体，每个试管加样完毕后更换移液管或移液头。
- **把稀释的溶液加到实验容器中。**由低浓度向高浓度将需要的体积加到实验中或反应试管中，如果加到试管中物质的浓度依次升高，可以不用更换移液管。

配方

表 7-2 酸和碱浓度：常见的商业品浓度

物质	分子式	分子质量	mol/L	克/L	质量百分比	配制 1mol/L 溶液（1L 加入的 ml 量）
醋酸	CH_3COOH	60.05	17.4	1 045	99.5	57.5
冰醋酸		60.05	6.27	376	36	159.5
甲酸	HCOOH	46.02	23.4	1 080	90	42.7
盐酸	HCl	36.5	11.6	1 172	70	85.8
			2.9	105	10	344.8
硝酸	HNO_3	63.02	15.99	1 008	71	62.5
			14.9	938	67	67.1
			13.3	837	61	75.2
高氯酸	$HClO_4$	100.5	11.65	1 172	70	85.8
			9.2	923	60	108.7
磷酸	H_3PO_4	80.0	18.1	1 445	85	55.2
硫酸	H_2SO_4	98.1	18.0	1 766	96	55.6
氢氧化铵	NH_4OH	35.0	14.8	251	28	67.6
氢氧化钾	KOH	56.1	13.5	757	50	74.1
			1.94	109	10	515.5
氢氧化钠	NaOH	40.0	19.1	763	50	52.4
			2.75	111	10	363.6

（由 Sambrook 等同意引用，1989）

表 7-3 不同浓度储备液大约的 pH 值

物质	1N	0.1N	0.01N	0.001N
乙酸	2.4	2.9	3.4	3.9
盐酸	0.10	1.07	2.02	3.01
硫酸	0.3	1.2	2.1	
柠檬酸		2.1	2.6	
氢氧化铵	11.8	11.3	10.8	10.3
氢氧化钠	14.05	13.07	12.12	11.13
碳酸氢钠		8.4		
碳酸钠		11.5	11.0	

（由 Sambrook 等同意引用，1989）

表 7-4　通常使用缓冲液的 p*K*a 值

缓冲液	分子量	p*K*a	缓冲范围
Tris[a]	121.1	8.08	7.1～8.9
HEPES[b]	238.3	7.47	7.2～8.2
MOPS[c]	209.3	7.15	6.6～7.8
PIPES[d]	304.3	6.76	6.2～7.3
MES[e]	195.2	6.09	5.4～6.8

a　Tris(hydroxymethyl)aminomethane(三羟甲基氨基甲烷)

b　*N*-2-hydroxyethylpiperane-*N*′-2-ethanesulfonic acid(*N*-2-羟乙基哌嗪-*N*′-2-乙磺酸)

c　3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid(*N*-吗啉代)丙磺酸

d　Piperane -*N*, *N*′-bis(2-ethanesulfonic acid)(哌嗪-*N*, *N*′-双(2-乙磺酸)

e　(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid(*N*-吗啉)乙磺酸

表 7-5　储备液的配制

溶液	配制方法
10mol/L 乙酸铵	800ml 水中溶解 770g 乙酸铵，定容至 1L，过滤除菌
10% 过硫酸铵	10ml 水中溶解 1g 过硫酸铵，溶液 4℃可保存几周
1mol/L $CaCl_2$	200ml 纯水溶解 44g $CaCl_2 \cdot 6H_2O$，0.22μm 滤膜过滤除菌
1mol/L DTT	20ml 0.01 mol/L 的 NaAC（pH 5.2）中溶解 3.09 g DTT，过滤除菌，分装成每管 1ml，－20℃冰箱保存
0.5mol/L EDTA（pH8.0）	186.1g $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ 加入到 800 ml 水中，磁力剧烈搅拌溶解，NaOH（约 20g）调 pH 到 8.0，高压灭菌
溴化乙锭（10 mg/ml）	100ml 水中溶解 1g 溴化乙锭，磁力搅拌器搅拌数小时确保溶解完全，用铝箔纸包住容器或者将液体转移到深色瓶中，室温保存 **注意**：溴化乙锭为强诱变剂，剧毒，称量和溶解固体时应戴手套和口罩。
1mol/L $MgCl_2$	800 ml 水中溶解 203.3g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$，定容至 1L，高压灭菌
β-巯基乙醇(BME)	通常获得的是 14.4mol/L 的溶液，4℃棕色瓶保存
酚-氯仿	将等体积的酚和氯仿混合，用 0.1mol/L Tris·HCl（pH 7.6）平衡和萃取多次，分相后，上层水相为 0.01mol/L Tris·HCl（pH7.6），然后将混合物放于 4℃棕色瓶保存 **注意**：酚具有强腐蚀性，能灼伤皮肤，使用酚的时候应该戴手套和护目镜，穿防护衣，操作最好在通风橱内进行。一旦酚溅到皮肤上应该马上用大量的水冲洗，并用肥皂洗涤，不能用乙醇冲洗
10mmol/L 苯甲基磺酰氟（PMSF）	用异丙醇溶解 PMSF 至终浓度为 1.74mg/ml（10mmol/L），溶解分装后于－20℃保存，如果需要的话，可以配制 17.4mg/ml 的母液保存 **注意**：PMSF 能够对眼睛、皮肤、呼吸道和黏膜造成伤害吸入、吞咽或者皮肤吸收会致命。一旦接触，应该用大量的水冲洗眼睛和皮肤，丢弃污染的衣服
磷酸盐缓冲液（PBS）	800ml 蒸馏水溶解 8g NaCl，0.2 g KCl，1.44 g Na_2HPO_4 和 0.24g KH_2PO_4，HCl 调 pH 到 7.4，定容至 1L，15 psi 湿热灭菌 20min
1mol/L 醋酸钾（pH7.5）	90ml 纯水（Milli-Q）中溶解 9.82 g 醋酸钾，用 2mol/L 醋酸调 pH 到 7.5，定容至100ml，小管分装后于－20℃保存
醋酸钾（用于碱性裂解）	60ml 5 mol/L 的醋酸钾溶液中加入 11.5ml 冰醋酸和 28.5ml 水，最终溶液中有 3mol/L 钾，5mol/L 醋酸
3mol/L 醋酸钠（pH5.2 和 7.0）	800 ml 水中溶解 408.1 g $NaAC \cdot H_2O$，用冰醋酸调 pH 到 5.2 或者 7.0，用水定容至 1L，高压灭菌。
5mol/L NaCl	800ml 水中溶解 292.2 g NaCl，定容至 1L，高压灭菌。

续表

溶液	配制方法
10% SDS	900ml 水溶解 100g 电泳级 SDS，可以加热到 68℃ 助溶，加入 HCl 调 pH 到 7.2，用水定容至 1L **注意**：称量 SDS 时戴上口罩，因为 SDS 的粉末很容易到处乱飞，配完之后还应该擦干净。10% SDS 应该灭菌
20×SSC（3.0mol/L NaCl 和 0.3mol/L 柠檬酸钠）	800ml 水中溶解 175.3g NaCl 和 88.2g 柠檬酸钠，10N NaOH 调 pH 到 7.0，用水定容至 1L，高压灭菌
20×SSPE	800ml 水中溶解 175.3g NaCl、27.6g NaH_2PO_4 和 7.4g EDTA，NaOH（10 N 溶液约6.5ml）调 pH 至 7.4，用水定容至 1L，高压灭菌
TCA 溶液 100%	在 500g TCA 的瓶中加入 227ml H_2O，终浓度 100%（*W/V*）
1mol/L Tris	800ml 水中溶解 121.1g Tris，用 HCl 调至所需要的 pH 值， pH　　HCl 7.4　　70 ml 7.6　　60 ml 8.0　　42 ml **注意**：如果溶液呈黄色，应该丢弃，重新用更好的 Tris 配制； 调 pH 的时候应该把溶液冷却到室温再调，用水定容至 1L，分装，高压灭菌； Tris 溶液的 pH 值会因温度的变化而变化，温度每升高 1℃，pH 下降 0.03 单位，例如，0.05 mol/L 的 Tris 在 5℃、25℃、37℃ 时的 pH 值分别为 9.5、8.9 和 8.6
50× Tris-醋酸-EDTA 缓冲液	500ml 水中溶解 242g Tris，加入 100ml 0.5mol/L EDTA（pH 8.0），加入 57.1ml 冰乙酸，用水定容至 1L，高压灭菌
TBS（25 mmol/LTris）	800ml 水中溶解 8g NaCl、0.2 g KCl 和 3g Tris，加入 0.015 g 酚红、HCl 调 pH 到 7.4，用蒸馏水定容至 1L，15psi 高压灭菌 20min，室温保存

（由 Maniatis 等同意，修改引用，1982）

制备酚和酚氯仿

酚

多数批号的商品化液态酚都是透明和无色的，不需要重蒸可以直接用于分子克隆。有时，买来的液态酚变成粉红或者黄色，应该退还给生产商。不提倡使用结晶酚，因为它需要在 160℃ 重蒸除去氧化物醌，醌会导致磷酸二酯键断裂或者使 RNA 和 DNA 交联。

注意：酚具有强腐蚀性，会灼伤皮肤，使用酚的时候应该戴手套、护目镜和穿防护衣，操作时在通风橱内进行。一旦酚溅到皮肤上应该立即用大量的水冲洗，并用肥皂洗涤，不能用乙醇冲洗。

平衡酚

使用前，必须将酚平衡到 pH>7.8，因为 DNA 在酸性条件下会进入有机相。

1. 液态的酚应该储存在 -20℃，使用时升温到室温，然后放在 68℃ 下加热溶解，加入羟基喹啉至终浓度为 0.1%，羟基喹啉是抗氧化剂和 RNAase 的部分抑制剂，还是金

属离子的弱螯合剂（Kirby 1956）。另外，酚的黄色提供了一个简便区分有机相和水相的方法。

2. 对于熔化的酚，加入等体积的缓冲液［室温加入 0.5 mol/L 的 Tris·HCl（pH 8.0）］，磁力搅拌 15 分钟后关掉磁力搅拌器，当两相分离后，用带真空的玻璃移液器尽可能多地把水相吸掉。
3. 加入等体积的 0.1mol/L 的 Tris·HCl（pH 8.0），磁力搅拌器搅拌 15 分钟后停止搅拌，按照第二步操作那样尽量吸掉上层的水相，多次重复用 Tris·HCl 萃取，直到酚相的 pH 值大于 7.8（用 pH 试纸测量）。
4. 当酚最终平衡好后，应该吸掉最后的水相，加入 0.1 倍体积的 0.1 mol/L 的 Tris·HCl（pH 8.0）（含 0.2% β-巯基乙醇）。含 100 mmol/L Tris·HCl（pH 8.0）的饱和酚溶液放在棕色瓶内 4℃ 可保存一个月。

酚:氯仿:异戊醇（25:24:1）

含等量酚-氯仿-异戊醇的混合物常在抽提核酸的实验中使用，以除去蛋白质。氯仿能够使蛋白质变性，并且有助于水相和有机相分离，异戊醇可以减少萃取过程中产生的泡沫。

氯仿和异戊醇在使用前都不需要预处理，酚-氯仿-异戊醇混合物可以储存在 100 mmol/L Tris·HCl（pH 8.0）溶液中，放在棕色瓶中 4℃ 可保存一个月。

称量和混合

配制缓冲液时**称量药品**并不是一件困难的事情，但却是最重要的事情。称量以前应该找齐**所有**需要的东西，这样你就没有必要为了寻找一个干净的烧杯而将药品搁置在天平上。

> 永远不要直接在天平盘上称量样品。

你将需要

称量纸　用于称量质量小于 1 g 和体积小于一个高尔夫球的固体样品。

称量器　它们有不同的大小规格，取一个比需要的稍大一些的。小烧杯可以用于称量液体或者大量的粉末。

刮刀　刮刀同样有大小不一的规格，使用金属或者一次性材料做成的刮刀。需要大量药品时用大刮刀，少量药品用小刮刀，使用时不要犯错。

干净的量筒　量取你所需要体积的液体，宁愿选择大的量筒量取自己所需要的液体，而不要使用小量筒多次量取。

烧杯或者三角烧瓶　不管配制什么缓冲液，应该选择允许混合和可以测定 pH 值的烧杯或三角烧瓶，对于 500ml 液体，选择 1L 的烧杯。

> 在热盘上不要使用塑料烧杯或者烧瓶。

磁力搅拌盘和搅拌子　磁力搅拌盘不需要加热器，搅拌子应该确保能在烧杯或三角烧瓶中自由转动。

处置刮刀和磁力搅拌子的地方 各实验室有其不同的处理方法，看一看是否应该被立即清洗，或者放在一起集中清洗。

擦拭纸 这是实验室用于擦拭和清除污迹的纸。

蒸馏水 常用的溶剂是水，用膜过滤的或玻璃蒸馏器蒸馏过的水，不要使用自来水。

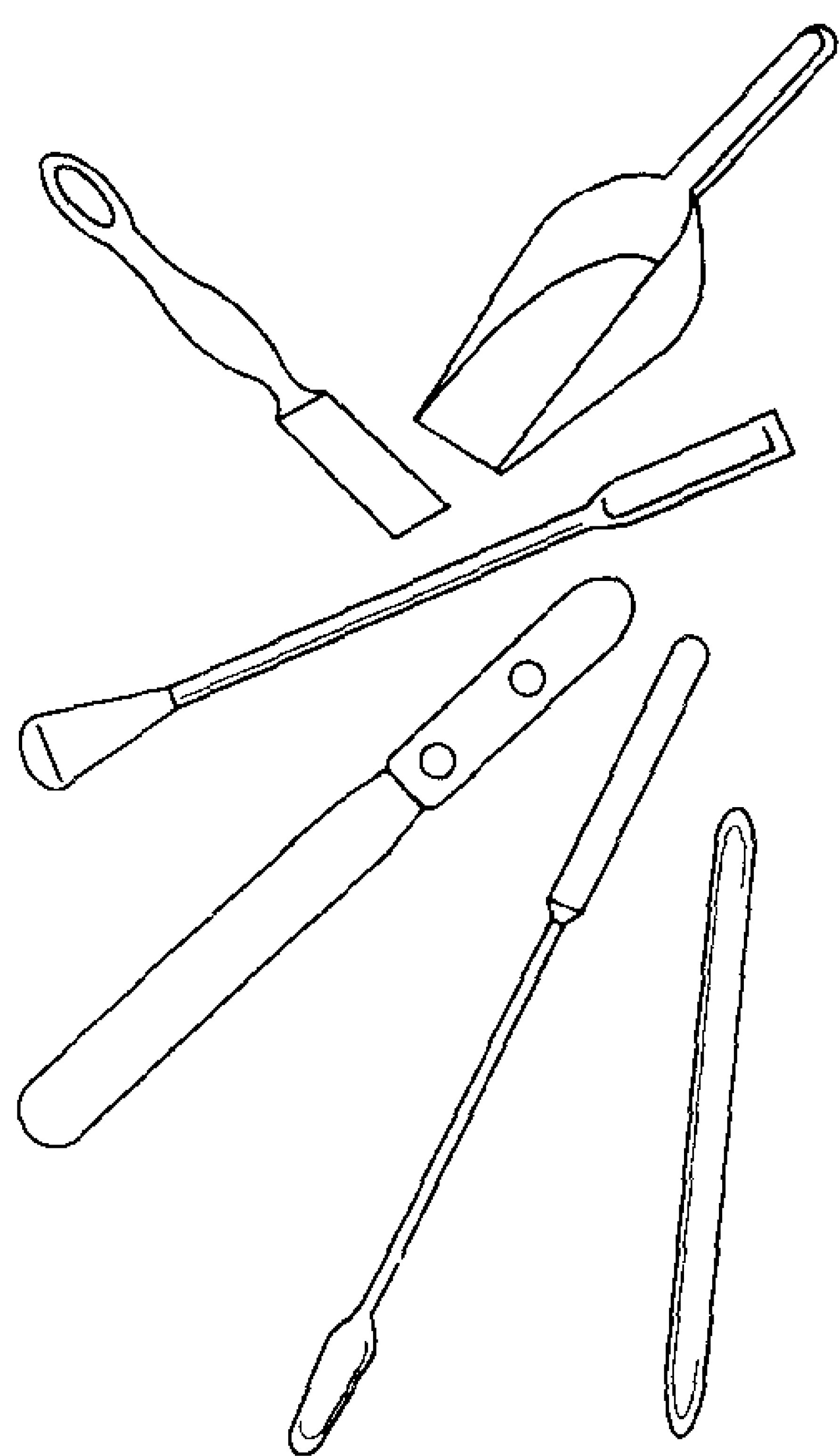


图 7-4 称量器具

在不同的实验室和不同的公司有不同的名字，刮刀、小刮刀、挖铲和勺子是其中的一些器具。绝大多数实验室的称量器具都有统一的名称，你应清楚它们是什么。

称量

1. **称量时戴上手套**。这样可以保护你和所要称量的药品，如果要限制手套的使用，那就在称量有危害物品的时候戴手套。
2. **阅读瓶上的标签**。看看是否需要戴面罩，因为许多物质是细粉尘状的，无论多么小心，都会有微量进入呼吸道。
3. **打开天平电源**。因不同的天平和不同的实验室，有些天平整天开着随时可以使用，但大多数地方的天平都是关着的。如果天平不干净，称量前打扫干净。
4. **称量称量纸及称量器的重量**。把称量纸或者称量器放在天平上，按一下毛重或者重量的按钮，天平就会自动归零。

> 一些天平没有自动称净重的功能，如果没有，必须手动称量容器。
> 1. 称量烧杯或称量器。
> 2. 记录重量。
> 3. 把所需物质加到刚刚称量过的容器中。
> 4. 称重，根据第 3 步称重计算所称物质的质量。

5. **称量材料**。用刮刀把广口瓶内的物质刮取一定数量放在称量纸/器上。开始时根据感觉可以多加药品，当天平指数接近所需数字时，加药品应越来越少，最好不要由瓶中直接倾倒药品，除非你有感觉并知道瓶内药品的特性，不要在称量时搞得一团糟。如果称量纸或者称量器皿上的药品太多，可以把药品放回药品瓶中，但只有以下情况可以：

   (1) 该物质没有吸湿性，吸湿的物质会吸收水分；

   (2) 除了干净的刮刀或者称量纸/称量器，没有直接触过其他东西。
6. **称量好所需药品，倒入烧杯或三角烧瓶中**。拿住称量纸的背面，把纸两端轻微折起呈漏斗状，缓慢将药品倒入。如果药品黏在称量纸上，可以沿烧杯边缘将残留物敲入杯中。
7. **紧紧盖上药品瓶盖**。敞开的时间越长，落入的灰尘越多，别人更有可能把瓶子打碎或污染药品，即使你在称量其他物品，尽可能快地换个瓶子，消除混乱，越快犯错误或者污染的概率越小。

> 标记！任何容器中如果装了东西都应该有标记，即使你把它放在实验台上 1 分钟。即时贴是手头方便的标签。

8. **称量结束后，打扫天平。**用刷子把天平盘刷干净，或者用抹布、纸巾擦掉液体残物，用棉纸擦掉液滴。如果你把药品溅到天平托盘上，用蒸馏水清洗托盘，然后晾干。确认整个称量区域保持清洁，没有称量纸、烧杯、瓶子、纸巾和抹布。如果有必要，砝码也应该打扫干净。如果你不能马上加水，那么用铝箔或塑料纸盖住烧杯口，**做上标记，**把它放到自己的实验室台上。

混合

理论上说现在你能做的事情就是加水，但对于这个简单的过程有不同的操作，例如，有人会把药品倒入装在量筒里的水中，用塑料膜封住量筒口摇晃。不要这样做，即使量筒不会破碎，溶液没有飞溅，也可能得不到完全溶解的溶液。还有些人直接把药品和水加到烧杯中，把烧杯当量筒使用量取体积。也不要这样做，这样配制的溶液不准确。

> 当混合酸和水时，记住老化学实验室的一句格言：照你应该做的去做，将酸（碱）往水里加。

对于多数溶液

1. 加入终体积约 80%的水到烧杯中，然后加入固体溶质，要配 1L 的溶液，就加800 ml 水，用量筒量取。**注意：**对于浓缩的溶液，超过 3 mol/L 或者 5 ×，会因为溶质太多阻止搅拌子的转动，这时在已是 80%终体积和搅拌子转动的情况下，缓慢加入药品，每次不超过 2 药匙，确认加入药品前水中的固体已经充分溶解，再加入剩下的药品。如果药品很难溶解的话，可以加热搅拌助溶。在调 pH 以前，应该把溶液冷却到室温，否则你得到的是错误 pH 值的溶液。
2. 轻轻放入磁力搅拌子，搅拌子大到足够在溶液中自由转动。
3. 先把烧杯放在磁力搅拌器上，然后低速打开搅拌开关，缓慢调大转速。如果一开始转速调得太大或者放烧杯之前就打开搅拌器，搅拌子容易乱跳而打破烧杯。如果搅拌子转动没有规律，关掉搅拌器，等搅拌子停止转动后，再重新打开开关，缓慢提高转速。
4. 待溶质充分溶解后停止搅拌。
5. 把溶解完全的溶液倒入量筒或烧瓶中，测定体积，加溶剂使整个溶液的体积接近所需体积的 90%。
6. 将溶液倒回烧杯或三角烧瓶中，调 pH 值。
7. 在烧杯上标记好内容物。用标贴纸，不要直接写在瓶子、量筒或烧瓶上。

> 如果不需要确定溶液的 pH 值，则将体积定容至 100%，立即倒入适合灭菌的容器中或过滤除菌。

> 调好 pH 值后，将溶液倒入量筒或测定体积的烧瓶中。定容至需要的体积。

测定 pH 值

所有在生物学实验中用到的缓冲液和溶液都应该有合适的 pH 值，**这很关键。**溶液在灭菌之前都应用 pH 计测定和调节 pH。

☆ **调节 pH 的技巧**

- pH 计有敏感的电极用于测量溶液中的 H^+ 浓度，电极由塑料套子保护，使用时还是要注意避免将电极碰撞玻璃器皿或者搅拌子。不使用时，电极应该放在装有中性缓冲液（浸泡缓冲液）的小烧杯或者药品杯中。一些 pH 计尤其是新型 pH 计上有许多不同功能的按钮，你不一定要全部知道这些按钮在测定 pH 中的作用，只需用到待命、标准化和 pH 按钮。
- 有几种类型的 pH 电极，有的电极里灌注了凝胶或者液体，有些则没有；有的电极需要维护，而有些则不需要。在许多实验室，如果 pH 电极不出问题的话，人们不会关心自己使用的 pH 电极的类型。当你发现 pH 电极出现问题时，应该与实验室其他成员讨论，或者询问 pH 电极的供货商。
- 每天都应该使用已知 pH 值的两种溶液来校准 pH 计。pH 计的校准基于标准溶液的 pH，不要仅仅用 pH 为 7 的溶液来进行校对，习惯上有一股懒惰和担心情绪。但这是必要的，如果不校准会引起差异而带来麻烦。

> 不要用抽屉里找到的 pH 试纸确定溶液的 pH 值，pH 试纸只能检测少量体积溶液的 pH 值和在用 pH 计测定前快速测定 pH。取一滴溶液滴到试纸上进行测试，不要把 pH 试纸直接放到溶液中测定。

- 如果要调整一系列溶液的 pH 值，每次测量时都不用重新校准。如果有人把 pH 计弄脏了，应该重新校准后再使用。
- pH 值会影响溶解度，例如，0.5 mol/L 的 EDTA 是分子生物学的常用试剂，常被配制成 pH 8.0，溶解的时候如果 pH 值不到 8.0，EDTA 很难溶解。
- pH 值会随着温度的变化而变化，调节溶液 pH 值时应该使用相同温度下标准缓冲液校准的 pH 计。

校准 pH 计

- **至少两种 pH 标准溶液。**在 pH 计附近可以找到 pH 为 4、7 或者 10 的标准溶液，许多实验室的标准溶液都是直接购买配方的，一般储存在 500 ml 的瓶子里，通常使用 pH 4 和 10 的标准溶液就足够了。
- **3～4 个 50 ml 的玻璃或塑料药品杯中。**
- **棉纸**

1. 将电极从浸泡（或储备）缓冲液中拿出，用蒸馏水冲洗。将电极放在烧杯上方冲洗，不要把电极浸泡在烧杯里，这时的 pH 计应该处于待用位置，用棉纸巾小心擦干电极外面的液体。

> 根据将要测定溶液的 pH 值选择校准用的标准溶液，如果你要调的 pH 为极端 pH 值（大于 10 或者小于 4），需要选用接近目标的 pH 标准溶液来校准。例如，需要调节 pH = 3 的溶液，最好选用 pH 为 2 和 4，或者 2 和 7 的标准溶液来校准，使用完后，重新用 pH 4 和 10 的标准液来校准 pH 计。

用一种缓冲液校准

如果你要测定的溶液的 pH 和标准液的 pH 相近，只需要用一种标准液进行校准。

- 对于中性溶液使用 pH 7.0 的标准溶液，对于碱性溶液选择 pH 10 的标准溶液，对于酸性溶液选择 pH 4.0 的标准溶液。
- 按照两种标准液校准方法校准 pH 计和测定 pH 值，如果要测定不同 pH 的缓冲液，重新校准 pH 计。

2. 倒出约 1.5 英寸的 pH 4 的标准溶液（也可能是 10）倒在小烧杯或药品杯中，盖上瓶盖，把电极头浸入烧杯的溶液中。
3. 按下 pH 计上的“标准化”按钮，直到仪器上显示稳定的 pH 为 4。
4. 按下“待命”按钮，拿出电极清洗干净并擦干。
5. 把 pH 10 的溶液倒入另外的烧杯中，浸入电极，按下 pH 计上的“标准化”按钮，直到仪器上显示稳定的 pH 为 10。
6. 按下“待命”按钮，拿出电极，清洗干净并擦干，把电极插回保存液中保存。
7. 测定标准化缓冲液的 pH，如果测量结果和其 pH 值不符，应该重新校准 pH 计，这时标准化的 pH 计可用于测量大多数溶液的 pH。

测定 pH

准备好材料，如磁力搅拌器、搅拌子和巴斯德移液管，还需要酸和碱调节 pH，pH 计附近应该有浓盐酸（12.1 mol/L）和 1 mol/L HCl、NaOH（5 或 10 mol/L）和/或 0.1 mol/L NaOH。

需要什么试剂来调节溶液的 pH 值？

大多数实验室使用 HCl 和 NaOH 来调节缓冲液的 pH 值，（其他强酸、强碱也可以使用），事实上使用 HCl 和 NaOH 调整溶液 pH 值会增加溶液中的阴离子（Cl^-）或者阳离子（Na^+）的浓度而在一定程度上干扰实验，但通常认为只能这样做，例如，Tris-Cl 缓冲液意味着溶解 Tris 碱后用 HCl 来调节溶液中的 pH 值，Tris-醋酸缓冲液意味着用醋酸来调节 pH 值。

也可以分别加入缓冲液中的酸和碱的成分来获得需要的 pH 值，磷酸和醋酸缓冲液经常就这么配制。如果知道 p*K*a 值的话，可以计算出特定 pH 值溶液所需酸或者碱溶液的比例，但你可能永远也不会这么做。实验步骤或配方会告诉你配制特定 pH 值所需溶液的酸或者碱的量，或者可以查阅手册中相关的表。

1. 在磁力搅拌器上搅拌准备调 pH 的溶液，搅拌子的搅拌速度要尽可能的慢，减少电极错误接触到摇瓶或者三角瓶瓶底时电极损坏的机会。
2. 将电极从保存液中取出，用蒸馏水冲洗干净并用棉纸小心擦干，pH 计的状态应保持在“待命”，不要直接把电极浸入到烧杯里冲洗。
3. 把电极头浸入需测定的溶液中，打开磁力搅拌器以前，确信搅拌子不会碰撞到电极。
4. 如果 pH 计上有功能转换开关，从“待命”转到“pH 测定”。（如果需要取出电极涡

旋混合，首先将功能开关调至“待命”。)

5. 待仪器读数稳定后，读取数值。如果 pH 值太低，用 NaOH 来调节；如果 pH 值太高，用 HCl 来调节。用巴斯德移液管和吸耳球或者移液器来转移调节 pH 的酸或碱溶液。调节不同的溶液要使用不同的移液器，逐滴加入酸或碱溶液，等搅拌溶液显示的 pH 稳定不再改变后再滴入第二滴液体。

   如果 pH 很难调到需要的数值，可以用浓 HCl（12.1 mol/L）或者 NaOH（5 或 10 mol/L），其他情况都用 1 mol/L HCl 或者 0.1 mol/L NaOH。

   继续逐滴加入酸或碱溶液，直到达到所需的 pH 值。在达到缓冲 pH 值前可能需要很多滴溶液，如果 pH 没有变化，可以使用更浓的溶液来调节，但是要非常小心，缓慢操作，一滴一滴地进行。

6. 将 pH 计的功能调回到“待命”。
7. 将电极从溶液中拿出，用蒸馏水冲洗干净，小心用棉纸擦干。
8. 将电极浸入储存缓冲液。
9. 把调好 pH 值的溶液倒入量筒或者容量瓶，定容。
10. 把定容好的溶液倒入有盖的玻璃瓶或塑料瓶中（见下面可以灭菌的塑料器皿），用密封用的石蜡薄膜封口，不要把溶液储存在烧瓶、烧杯或者量筒里。

> 确认搅拌子没有和瓶中的液体一起灭菌，没有什么事情能比看到将搅拌子和灭菌的溶液放在一起更令人恼火。如不小心将搅拌子倒入瓶中，在灭菌之前，必须用长磁性棒将搅拌子取出。

11. 在瓶子上贴上标签，使用标签纸和记号笔，写上配制日期（包括年份）、成分、浓度、pH 值以及你的姓氏（名）。
12. 贴好标签后，拿去灭菌，这种标签对热敏感，灭菌后会变暗。如果不能马上灭菌，可以先把溶液放在 4℃ 以降低污染的机会。

☆ 如果 pH 计读数古怪，检查：

- **电极**。有些电极含有缓冲液，必须维护。如果是这样，灌上合适的缓冲液（查看手册），旋紧。电极可能被碰坏或者打碎，需要更换。
- **pH 标准溶液**。人们经常把使用后的标准液倒回标准液的瓶子中，并认为仍像新的一样干净，不对，这种操作会有负面效应，应把标准液放入一个新的瓶子里。
- **缓冲液的温度**。由于 pH 值受温度影响，确认所有缓冲液在测定 pH 前保持室温。常见的祸首是刚蒸馏出来的水（太热）、冰箱里的水（太冷）或者热盘搅拌的热使配制的缓冲液过热或过冷。
- **电极储存液**。如果烧杯中的电极保护液干了，电极头上面则会有盐结晶，用水冲洗干净后，把电极放入装有新保护液的烧杯里。
- **你的技术**。操作不同缓冲液之间都要清洗电极，调节 pH 时搅拌子的转速应该适度。

> **Tris 缓冲液**的 pH 很难调，pH 计上的读数不稳定，一些电极不能准确测出 Tris 缓冲液的 pH 值，特别是银/氯化银参比电极，测不准含有蛋白质的 Tris 溶液的 pH。
>
> 调好 Tris 溶液的 pH 后，10 分钟之后再测一次 pH，如果读数和原来的不一样，电话询问电极或者 pH 计生产商。
>
> 多数 Tris 溶液中没有蛋白质，调 pH 的时候不会出现什么问题。

溶液灭菌

☆ **灭菌或者过滤?** 为了防止细菌和真菌的生长，大多数溶液在使用和储存前都会进行无菌处理。虽然过滤除菌很有效，但对于大体积的缓冲液来说过滤除菌是非常单调的，一般采用灭菌。

确认你的溶液可以灭菌。热不稳定组分的溶液不能够灭菌，含有这样成分的溶液应该过滤灭菌，或者先把其他组分灭菌后，再加入过滤灭菌的热不稳定组分。

☆ **高压灭菌**

- 多数的缓冲液。
- 不明确的细菌和酵母培养基。

☆ **不能高压灭菌**

- 含有去垢剂的缓冲液，如 10% SDS，会因为沸腾而溢出。
- 有机溶剂，包括酚。
- 含有热不稳定组分，如血清、维生素、抗体和蛋白质（如 BSA）。
- 哺乳动物、植物和昆虫的培养基。
- 含 HEPES 的溶液。
- 含有二硫苏糖醇（DTT）或者 β-巯基乙醇（BME）的溶液。

> 即使你不要求缓冲液无菌，但还是应该先把溶液灭菌，因为微生物的生长会引起 pH 值的改变，并会改变缓冲液的性质和功能。

> 如果一个热不稳定或不能高压灭菌的成分要加到高压灭菌的缓冲液中，先高压灭菌缓冲液，待冷却到室温温度后，再加入过滤除菌的组分。

高压灭菌

高压灭菌是把物品放在高温（121℃）和高压下维持作用，如果你不熟悉高压灭菌锅，请别人给你示范一下，虽然正确操作时很安全，但它并不是实验用仪器。

确认要灭菌的烧瓶是硼钛酸盐玻璃或是可以灭菌的塑料，玻璃瓶常用于装缓冲液，可以重复灭菌。脆性塑料瓶不适合用于高压灭菌，但你必须查实手册或询问别人。

1. 灭菌的时候至少要留出约占烧瓶或瓶子 1/4 体积的的空间，这样沸腾的液体就不会溢出。
2. 将灭菌容器放在金属托盘或者可以高压灭菌的塑料托盘中，这样万一容器破碎也容易收集碎片。传统上认为应该在托盘里放上约 2 英寸厚的水，这样可以降低玻璃器皿因为压力变化而造成破碎的机会。这么做也许没有必要，但也不妨一试。
3. 灭菌时要把容器的盖子松开，防止瓶中的压力增大。如果使用锡箔作为瓶盖，用锡箔纸的一侧贴住瓶子，防止被气压顶开。
4. 灭菌前在每个容器上贴上高压灭菌的标签，这种标签对压力敏感，灭菌之后会显示某种图案或发生颜色改变，灭菌之后在标签上写上日期。
5. 关上并拧紧高压灭菌锅的盖子（门），但是也不要紧到打不开，如果是双门的高压灭菌锅，确认两个门都拧紧。

6. 调好合适的设置，开始灭菌。大多数高压灭菌锅都是自动的，需要最少体积的液体（玻璃容器中的液体控制降温和压力释放）和干燥设置（不需要降温过程）。新型可以设置程序的高压灭菌锅可以像手动操作一样有许多程序来灭菌。如果灭菌物品的体积大，需要的循环比小体积的要长。

   装有 1L 培养基的 2L 烧瓶，应该灭菌 30 分钟。

7. 确认高压灭菌锅在打开前，其中的压力已经回复到和周围环境的压力一致，打开的时候要缓慢，站在门的背后，避免与溢出的蒸汽接触。
8. 戴上防热手套，手套应该大且质地厚重，不要使用一般的厚布和用于微波炉的手套。
9. 取出灭好菌的容器之前要拧紧容器的盖子，否则会使溶液沸腾溢出。
10. 将瓶子放在室温下缓慢冷却，如果将瓶子立即放入冷库，玻璃可能会破碎，通常把灭菌容器放在实验台上冷却过夜。

避免物质沉淀、变色及分解

- 葡萄糖不能和含有氨基酸/蛋白胨或者磷酸盐的组分一起灭菌。
- 磷酸盐不能和含有氨基酸/蛋白胨或者其他矿物盐溶液一起灭菌。
- 含有矿物盐的溶液不能和琼脂一起灭菌。
- 灭菌培养基的 pH 不能高于 7.5。在中性 pH 下灭菌，待溶液冷却后再用无菌的碱调节到所需的 pH。
- 不要在 pH 6.0 以下灭菌琼脂溶液。

过滤除菌

如果是热不稳定的、易挥发的或者体积小于 20 ml 的溶液应该用过滤除菌。利用重力、加压或真空的方法，让溶液通过孔径足够小的膜（0.2 或者 0.1μm）除去大多数的微生物。注意：用 0.4 μm 的膜预过滤黏性溶液不能除菌，只有再次过孔径为 0.2 μm 的滤器，才能除菌。

0.2 μm 的膜被用于缓冲液和培养基的除菌，而 0.1 μm 的膜被用于组织培养的培养基除菌。

☆ **有许多商业销售的可重复使用或一次性过滤系统。**一些实验室或系里自己配制培养基，它们有大规模的泵驱动过滤系统。实验台上几种常用的供个人使用的过滤装置有：

- 非一次性的过滤装置，真空驱动抽滤，体积 20 ml～1000 ml。
- 一次性过滤杯装置，真空驱动抽滤，体积 15 ml～1000 ml。
- 带储备瓶的一次性过滤装置，真空驱动抽滤，体积 15 ml～1000 ml。
- 注射式滤器，体积 1 ml～20 ml。
- 微型注射式滤器，体积小于 1 ml。
- 旋转滤器、微型离心管滤器，体积小于 1 ml。

  无菌操作。过滤时应该在生物安全橱中操作以确保安全。详见第 9 章，无污染工作，如过滤除菌技术。

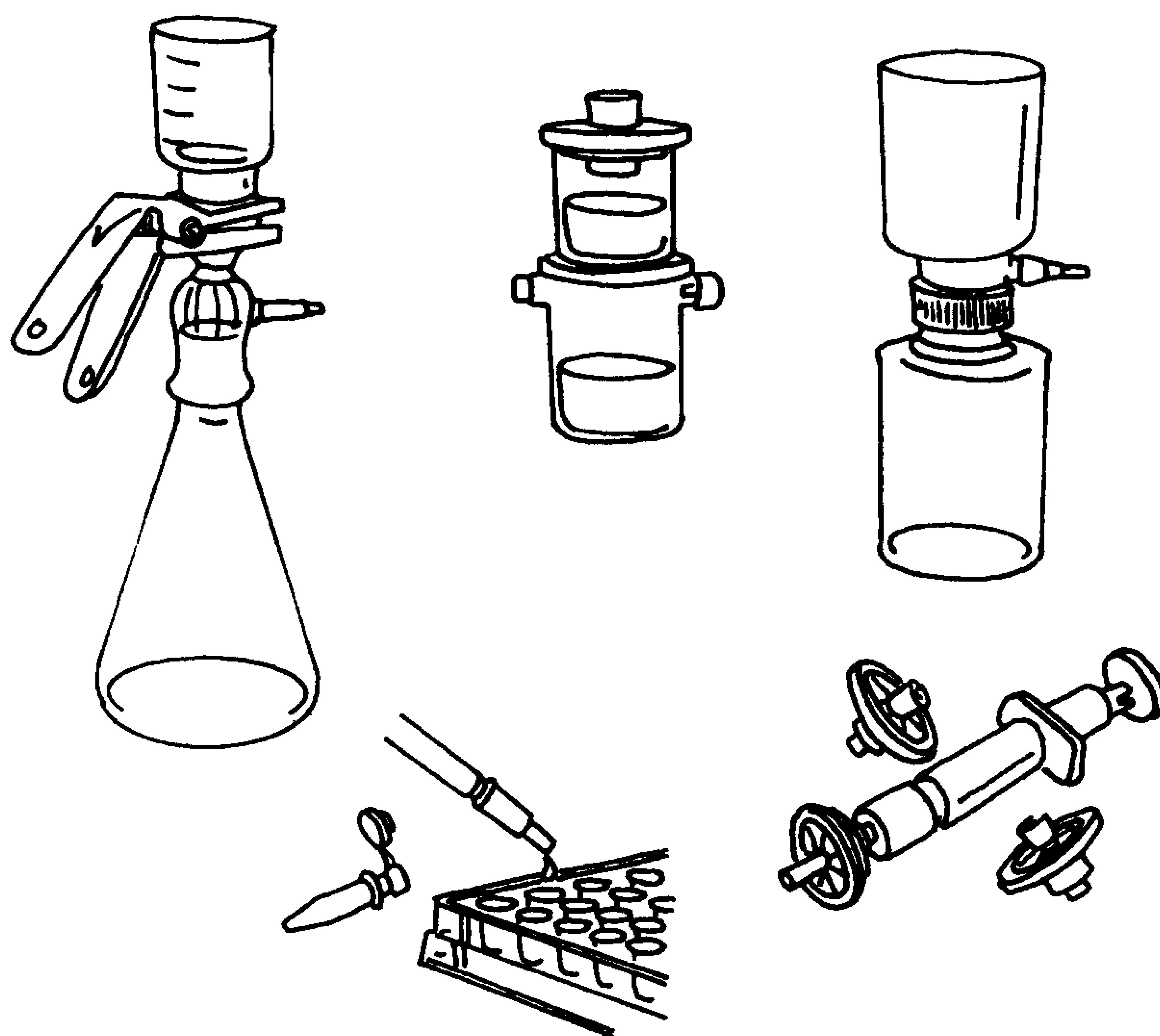


图 7-5 顺时针从左起依次为：非一次性滤器、一次性杯式滤器、带储备瓶的一次性滤器、注射式或微注射式滤器和微型离心管滤器

缓冲液和溶液的储存

☆ **培养基应该 4℃ 储存。**

☆ **缓冲液可以 4℃ 或者室温储存。**一些缓冲液特别是高浓度的缓冲液在较低温度下会产生沉淀。这通常不是什么问题，37℃ 加热几分钟就能使沉淀溶解。低温储存有利于降低使用过程中可能引入的微生物的生长。从心理学角度讲，人对待冰箱里的东西总比对待实验台上的东西更小心。通常用于培养的缓冲液放在低温保存，用于生化反应的缓冲液室温保存。

☆ **浓度高的溶液室温保存。**

☆ **光敏感试剂应该在适宜的温度下在棕色瓶中储存，或者放在盒子里的瓶内保存，瓶外裹上铝箔保存也可以。**溶液的储存详见第 8 章。

什么时候丢弃溶液

许多缓冲液可以使用多年，特别是经无菌处理和冷藏的，但有一些原因要丢弃溶液：

- **变色。**如果溶液看上去变了色，比如说略带黄色，就应该丢弃。也许这时溶液还可以使用，但是继续使用还不如重新配制新的溶液。使用缓冲液之前应该确认颜色是否正常，例如，MOPS，浓度超过 1 mol/L 的时候颜色就会微微变黄。

- **污染**。丢弃溶液的首要原因就是污染，通常情况下是霉菌，溶液会变浑浊，显现不连续的、球状颗粒、有时则呈白色或蓝绿色的苔状物质。如果干净无色的瓶子变浑浊，应该丢弃。有人会把杂质过滤后再继续使用，但那不值得，即使溶液再次除菌还会有一些微生物的代谢物掺杂进来。

如果怀疑试剂，就应该丢掉，不应该为污染了的试剂浪费自己的时间和金钱。

细菌污染一般不大可能，而且细菌污染不会仅仅污染试剂瓶底，不会把溶液弄浑，使用溶液前应该摇动瓶子看看溶液是否被污染。

- **沉淀**。溶液产生沉淀很难辨认出是细菌污染还是盐分析出。可以把试剂瓶放在37℃水浴锅加热20分钟，看看沉淀是否溶解，如果可以溶解，那则是因为溶液储藏的温度太低而导致盐析出，如果沉淀不能溶解，也不能确定是难溶的盐分还是发生了污染，最好还是把溶液丢弃。

如果真的需要判断溶液中的沉淀是盐结晶还是污染，可以滴一滴溶液在载玻片上，放到100倍的显微镜下观察，如果是盐结晶，会看到大的晶体，如果是污染，会看到细小的不规则形状的物质。

（洪　洁　王维荣　黄伟达）

参考文献

Cote R.J. and Gherna R.L. 1994. Nutrition and media. In *Methods for general and molecular bacteriology* (ed. P. Gerhardt et al.), pp. 155–178. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Gershey E.L., Party E., and Wilkerson A. 1991. *Laboratory safety in practice: A comprehensive compliance program and safety manual.* Van Nostrand Reinhold, New York.

Heidcamp W.H. 1995. *Cell biology laboratory manual.* Gustavus Adolphus College, St. Peter, Minnesota.
http://www.gac.edu/~cellab/index-1.html

Lenga R.E. 1988. *The Sigma-Aldrich library of chemical safety data,* edition II, vol. I and II. Sigma-Aldrich Corporation, Milwaukee.

Lide D.R., ed. 1997–1998. *CRC Handbook of Chemistry and Physics,* 78th edition. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Maniatis T., Fritsch E.F., and Sambrook J. 1982. *Molecular cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

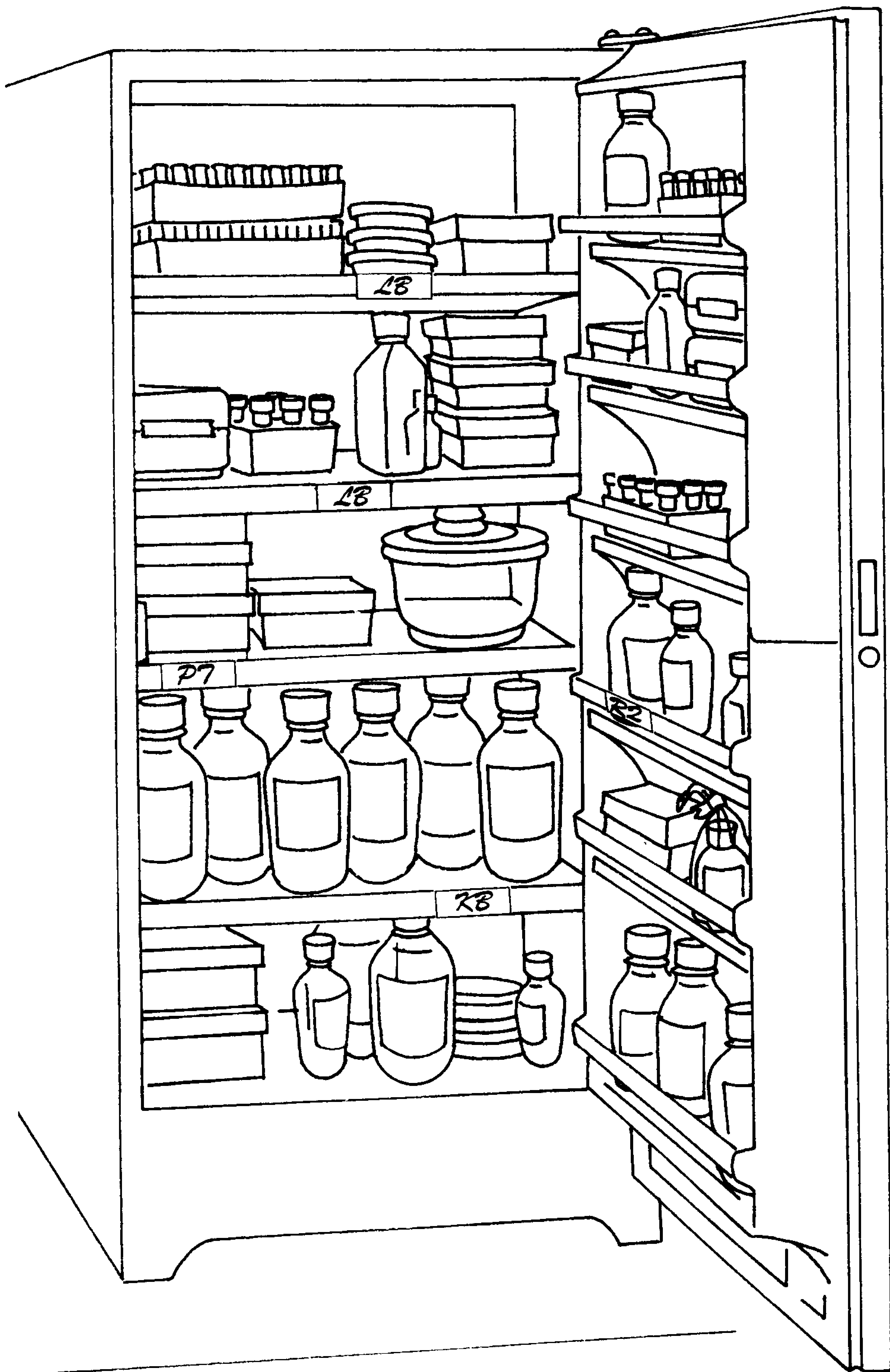
Roskams J. and Rodgers L., eds. 2002. *Lab ref: A handbook of recipes, reagents, and other reference tools for use at the bench.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sambrook J. and Russell D.W. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual,* 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sambrook J., Fritsch E.F., and Maniatis T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual,* 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sigma Chemical Company. 1996. *TRIZMA.* Tris(hydroxymethyl)aminomethane; Tris. Technical Bulletin no. 106B. St. Louis, Missouri.

Windholz M., ed. 1976. *Merck index,* 9th edition. Merck and Co., Rahway, New Jersey.


LB
LB
PT
KB

第8章　贮藏和处理

配完试剂后，在你使用过后或当你使用时，都必须将它放在特定的地方，实验室内的所有试剂都要考虑放置在适当的地方。对于实验材料的储存尤其重要。不恰当的储存会损害实验试剂和有机体，但对于实验废物来说就不明显了，虽然是安全和方便的问题，却不涉及你自己的安全和方便问题，所以人们就更不在意了。实验材料处理不正确会带来健康危害，能造成对环境的污染，胡乱丢弃实验废物在许多地区都是违法行为，而且可能会导致整个实验室的崩溃。

紧急贮藏

我们应该把它放在哪里??? 现在已经是凌晨1点钟了，你的实验比预期的时间多用了3个小时。实验室的其他人都已经走了，而你忘了问应该把管子放在哪里。

> 有疑问时，对于短期保存的试剂，冷冻是最好的方式。

你可以假定有多种方案用于处理，到了早上找到可以长期储存的方式去保存它。

- **酸或碱，**把它们留在实验台上直到第二天早上。单独保存酸和碱，如果瓶子打碎，聚乙烯的盘子可以容纳流出来的液体。
- **单克隆和多可隆抗体，**多数纯化过的抗体长期在4℃保存，但有一些需要－20℃保存。
- **分析管，**可以在4℃保存，但是试验的稳定性不同。大多数比色反应不能过夜测定。
- **细菌**

  平板或穿刺培养物，4℃。

  液体培养物，4℃。

  冻干培养物，4℃。

  冷冻培养物，－70℃。
- **缓冲液，**4℃。
- **细胞，**放回原处或者丢弃，绝对不要留下不知道来源的细胞。
- **去垢剂，**室温。
- **DNA，**4℃。
- **酶，**大多数限制性内切酶保存在－20℃，但一定要先阅读说明。有些酶不能冷冻。
- **乙醇，**室温。
- **生长因子和细胞因子，**－20℃。
- **危害性的化学物品，**你不能将危害性化学物品储存过夜，在开始使用这种药品之前，必须认真阅读该

> 乙醇是易燃易爆的危险品。在室温下，大量储存在高密度的聚乙烯或钢制安全罐中（镀铅、镀锌或316型不锈钢）。有些实验需要冰乙醇，最常用到冰乙醇的是细胞和组织的固定及核酸的制备。实验人员通常会在冰箱内用小瓶保存100％乙醇，但环境健康与安全部门人员在检查冰箱时常常会把它拿出来。冰箱储存乙醇必须注意防爆，也可以在实验前，取一部分在冰上冷却备用。

药品的储存和处理说明。

- **脂类**，－20℃，大多数脂类不稳定，对氧气或光线敏感，或者随温度变化而改变。
- **培养基**，4℃。
- **PCR 反应**，4℃，你会在 PCR 仪中发现先前使用过的反应管。
- **放射性同位素**

  ^{32}P：核苷酸态的，－20℃；磷酸盐的，4℃。

  ^{33}P：4℃。

  ^{35}S：甲硫氨酸的硫，－70℃。

  ^{125}I：^{125}I 蛋白质 A，4℃；单质 ^{125}I 通风橱室温保存。

  ^{3}H：4℃。

  ^{14}C：4℃。
- **RNA**，酒精中－20℃，水溶液－70℃。
- **血清**，4℃。

储 存 试 剂

长期储存。人们都希望在保存试剂时生物学或化学活性能保持最佳状态，同时必须被保存在一个安全的地方。这些要求对任何试剂都是一样的。必须对每一个试剂的状态进行检查，而不只是分类检查而已。

☆ **储存试剂须知**

- **温度要求**。把试剂储存在烘箱、室温、冰箱、低温冷柜或液氮中。
- **空气要求**。注意试剂是否对氧气敏感，或者需要其他气体保存。
- **湿度要求**。如果水蒸气对试剂有害，那么就必须干贮或者真空保存。
- **相关的危害**。注意试剂是否是放射性同位素、易燃、剧毒或挥发性的。如果是液体，是有机溶剂吗？

> 试剂必须按照储存要求存放，例如，如果一个试剂是放射性的、氧敏感的、需要冷藏物质，那它必须被贮藏于氮气中、放在允许储存放射性物质的冷库中的某个地方。

☆ **储存和丢弃须知的获取**

- **物质安全资料表（MSDS）**。它包括了每种化学物质的组成、性质、毒性、操作说明、泄漏处理和废物丢弃方法。如果你没有打电话给生产商，要求他们传真一份给你。
- **Merck 手册**。
- **环境健康与安全部门部**。环境健康与安全部门部门（EHS）可能保留有系里所有药品的资料表，即使你有相关的数据，也应该经常联系他们以获得有关储存和丢弃的管理规则。EHS 能提供关于储存和丢弃容器的建议，同时也能提供一些你所需要的容器。
- **在因特网上搜索**。许多大学、供货商和厂家在他们的网站上都提供了储存药品的详细方法。

☆ **怎样保存需要干贮的试剂**。水蒸气对许多试剂都有不利的影响，这种影响会使试剂失

去构型和生物学活性。这些试剂应该储存在装有干燥剂的密闭容器中，干燥剂可以吸收水蒸气，降低湿度，有时也可以放置在真空中以进一步减少水蒸气的量。

- **容器**

不要使用铝制容器，因为必须打开瓶子检查干燥剂。

容器必须能盖紧，内部有放干燥剂的空间。对于一些试剂，广口瓶是最好的。对于更大的瓶子来说，玻璃或塑料的干燥器是必需的。干燥器有不同的形状、大小和材料，应该首先考虑大小。

不要加真空润滑剂，否则密封就没有效果，你可以在容器的内部加润滑剂。

性质活泼的试剂需要真空保存，真空容器有一个喷嘴或是开口连接容器和真空泵。玻璃真空容器的上部和底部通常都有“O”形环和沟槽或是有光滑的边缘，这些情况都不需要真空润滑剂，顶部和底部光滑的玻璃真空容器则需要一点真空润滑剂以保证密封性。任何用于厌气培养细菌的容器也需要真空润滑剂。

- **干燥剂**

干燥剂通常是蓝色或紫色粗糙的碳酸钙小圆球，或是相类似的圆球。干燥剂一般装在袋子、桶或是有孔的罐子里。

干燥剂干燥时是蓝色的，潮湿的时候是粉红色的。干燥剂在大约200℃的烘箱中烘干1～3小时可以再生（实际使用的温度取决于干燥剂的数量和类型），恢复蓝色。干燥剂也可以用于气体的干燥，但大多数实验室并不采用。Drierite（W.A.Hammond Drierite公司注册）通常也当作干燥剂使用。

将容器放置于真空下

1. 将盖旋开，根据需要使用润滑剂。
2. 打开真空容器的喷嘴或是开关，使容器与空气相通。
3. 用真空管将容器和真空源连接。
4. 打开真空容器，家用真空容器效率低一些，对大容器抽真空可能需要几分钟，真空泵需要的时间要少一些。当你不能打开盖子的时候，说明已经真空。
5. 关闭容器，迅速关掉真空。
6. 等待几分钟后，将容器上的真空管拔掉。

打开真空密闭干燥器

1. 缓慢打开盖子，释放干燥器中的气体。
2. 小心的将盖子打开。
3. 假如盖子不能打开，则用平口的小刀在盖子和底部间缓缓的试探着搅动盖子，释放气体。
4. 当听到气体释放的声音时，用手托牢底部将盖子旋开。不要直接将盖子打开。

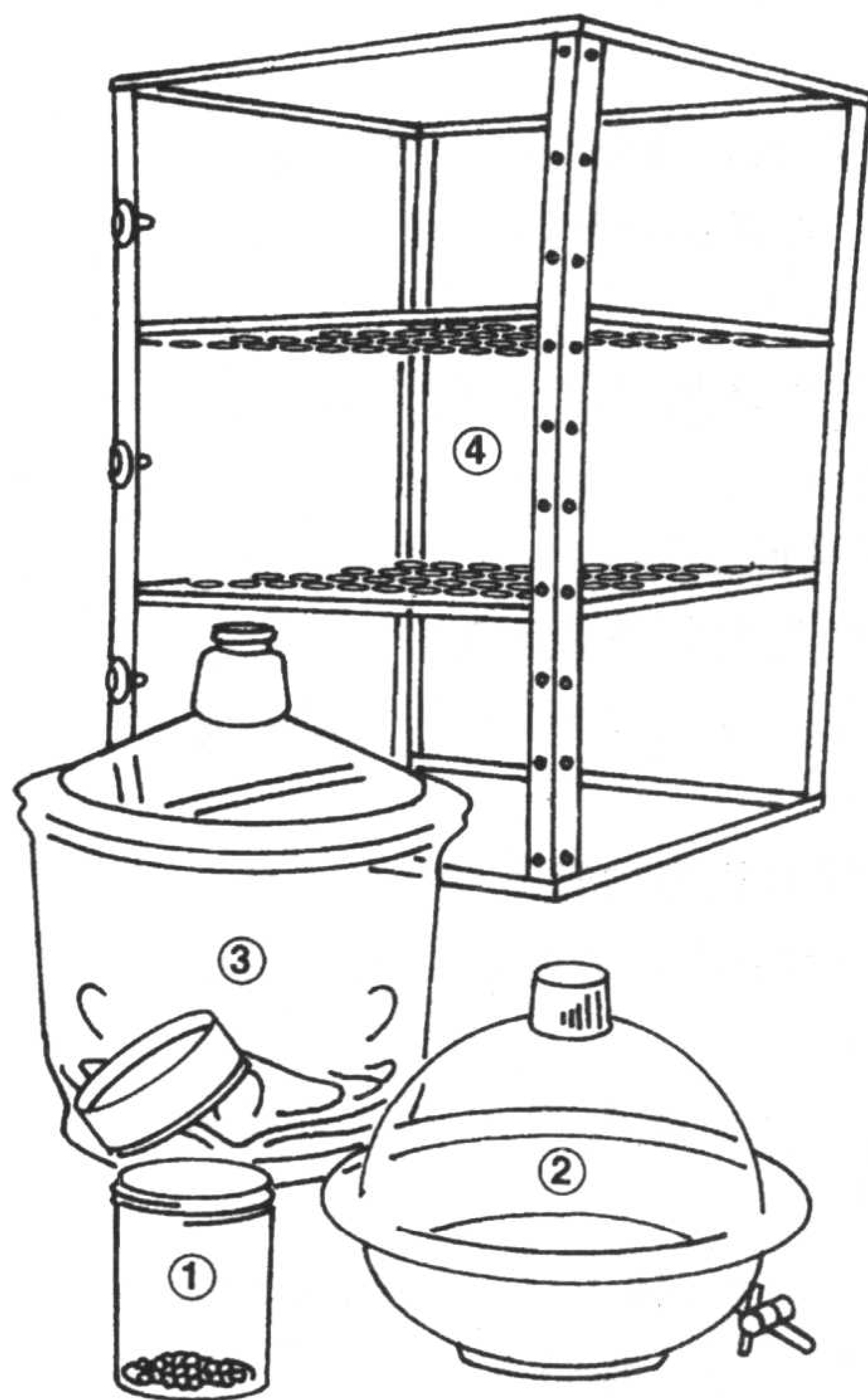


图 8-1　不同种类的干燥器

在所有容器的底部都有空间放干燥剂，除了顶部有螺纹的广口瓶外，大部分带或不带真空开关的类型都可以购买到。① 螺纹口的广口瓶，利于在室温下或冰箱中小试剂瓶的干燥；② 塑料干燥器，可以抗腐蚀和不易破裂的塑料，适于中等大小的瓶子；③ 玻璃干燥器，较大号的干燥器可以放置一些细菌培养皿和试剂瓶，这种类型的容器都比较重，最好在室温下使用，并且放置在固定位置；④ 干燥器架，这种架子能放置一些过滤器、平皿、试剂瓶和试管。

打开冷藏的干燥器

准则规定干燥器在打开之前必须拿到室温下，以避免容器内壁的水汽凝结。然而问题是容器内的反应物不仅在水而且在温度发生改变时会发生逆反应。

对于没有气体产生和不用润滑剂的干燥器，可以迅速将盖子打开取出你所需要的试剂，快速再将干燥器重新放入冰箱中。如果冰箱的温度适合，在盖上盖子之前可以用一块吸水纸迅速擦拭一下容器内壁，冰箱温度一般不会造成太大麻烦。

在打开真空干燥器之前应将其拿到室温下，冷润滑剂密封效果不佳，因此不能将加了润滑剂的干燥器迅速置于低温下，同时应避免任何水蒸气凝结的机会，只有在干燥器温度回升的时候才能打开。

☆ 如何储存光敏感试剂

如果从厂商运抵的试剂是储存在棕色瓶中的话，可以判断其是对光敏感的。尽可能将这种试剂储存在棕色瓶中，光敏感试剂打开以后，也应将其远离光源用棕色瓶或是琥珀色的瓶子储存，或者用铝箔包好。

管装试剂可以放在盒子中，可冻存或运输的盒子最适合。将常规的信息贴在盒

子上，如“内有光敏感试剂”，但是光敏感试剂应是盒子中的惟一试剂，不要在盒子中到处寻找其他试剂。

常见的光敏感试剂有放线菌素 D、丝裂菌素 C、氮蓝四唑（NBT）、酚、利福霉素和四环素。

实验室的平口刮刀是危险的，用后应立即将刮刀、手术刀丢弃，或者只保留一个能用的。保存时将刀锋利的一面插在树脂里，或放置在树脂的架子上，这样你就不会冒失地抓到刀口。可以把刀排列在狭小的盒子里。

☆ 如何储存氧敏感试剂

氮气通常是用以将氧敏感试剂中的氧气排出，这就是“在氮气环境下”的意思。

1. 氮气瓶必须放在化学通风橱的附近，因为通常有机溶剂的溶液需要氮气，使用时打开通风橱。
2. 确定氮气瓶用带子固定住（参见第 10 章气瓶的使用和压力调节）。
3. 将巴氏管插入和压力调节器相连的管子中。
4. 打开氮气，将流量调节到将管子靠近手背也几乎感觉不到为止。
5. 在通风橱中打开试管或瓶子，试管和瓶子应妥善地放置在架子上。
6. 将巴氏管的尖端放入容器口至能看到液体表面有波浪，保持 5～10 秒，较高的液体-气体比例需要更长的时间。
7. 迅速盖上容器。
8. 关掉氮气。
9. 保存瓶子。通常保存在 -20℃，也可以保存在真空。

不要认为冷库或冰箱最适合储存你放在干净瓶子里的试剂。

灭菌技术的使用可以阻止在试管中无氮气时细菌的进入。

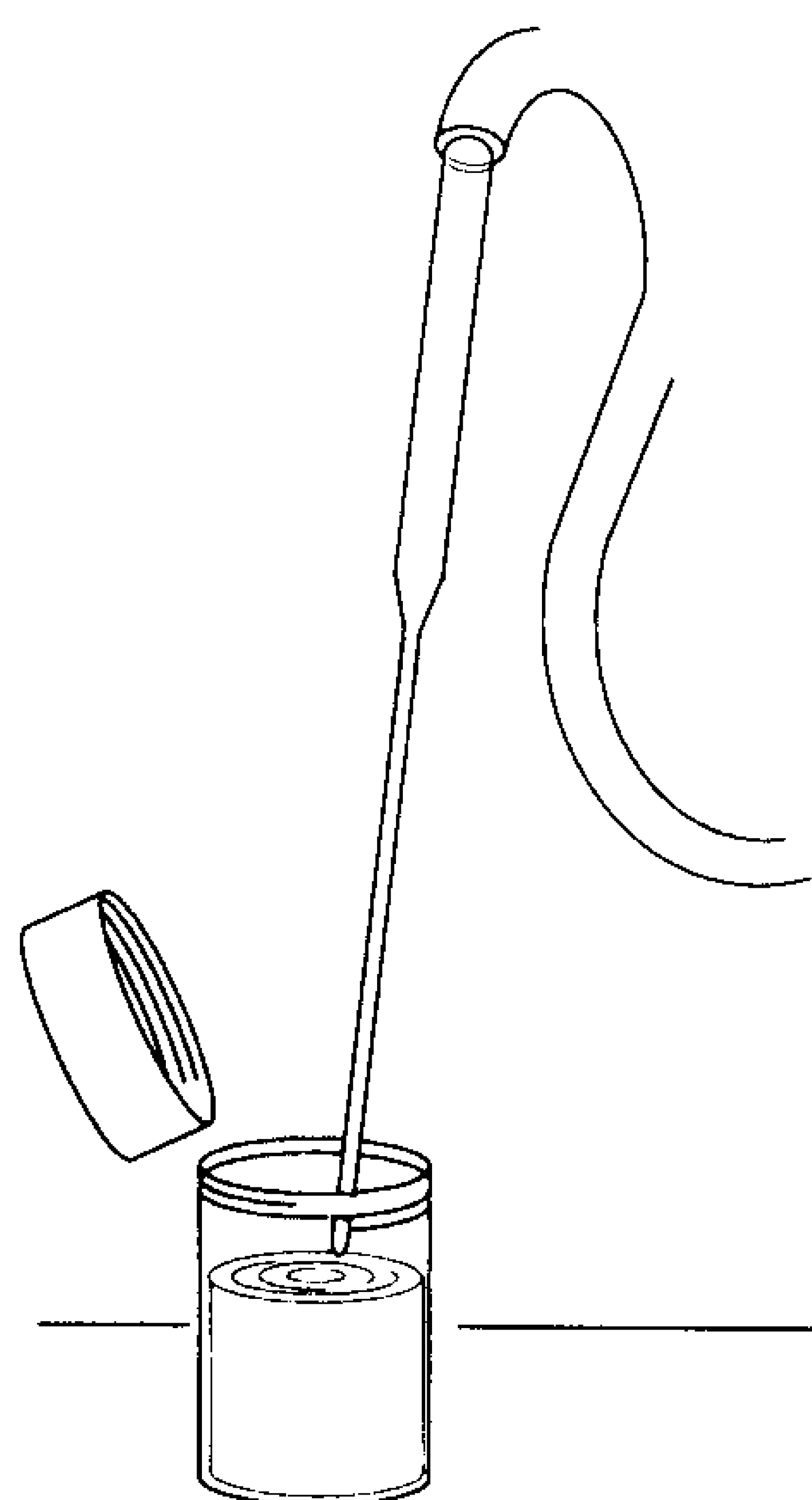


图 8-2　控制氮气流量使液面有轻微波动

分　　装

实验室中的许多物质都是以小体积储存的。

☆ 为什么要分装？

- **防止储存液反复冻融造成的降解。**许多物质不能反复冻融，而分装后的溶液只需使用 1～2 次就可丢弃，或者融解后可以在 4℃ 放置一小段时间，如血清和抗体。
- **避免多次使用造成的污染。**越多人使用储存液，越容易导致污染，即使是在储存温度下使用也会导致污染，如酶和培养基。
- **空间上方便。**操作一个 10 ml 的管子要比操作 500 ml 的瓶子容易得多。
- **节省时间。**相对于每次都要称量和溶解，分装只需要一次称量和溶解，只是有些占地方而已。

储存液是浓溶液，需要分装。工作液是将分装后的浓溶液稀释到所用浓度时的溶液。

通常分装的物质

抗生素 1:100 或 1:50 是常规使用的稀释度，组织培养和细菌培养所用抗生素的浓度见第 10 和 11 章。

抗体 多数抗体都不能反复冻融。

细菌 分装细菌最常见的用途是转化，把感受态细菌分装为适当的浓度可直接进行转化。

细胞 细胞必须以合适的浓度保藏在液氮或者低温冰箱中，以减缓细胞死亡的速度，以及复苏后没有一个明显的过量生长过程。

酶 通常酶以小包装购买。即使这样会贵一些，但对于特别大的实验室可以有专人对酶进行分装等的管理

血清 血清大量购买时会比较便宜，在没有反复冻融的情况下 -20℃ 保存活性最好。

☆ **什么时候不用分装**

- 稀释的物质不稳定。
- 不常用的物质。
- 使用不同浓度或浓度变化范围较大的物质。

储备或工作溶液的单位可能是重量/体积或物质的量浓度，保证两者都使用同样的单位。

☆ **如何分装**

1. 配置储备液须知：

- 物质的工作浓度。工作浓度通常也就是终浓度，单位可能为重量/体积或物质的量浓度。

例如，氯霉素作用于质粒扩增的浓度为 170 μg/ml，而用于细菌抗性筛选的作用浓度为 10～30 μg/ml。

- 在什么溶剂中溶解物质。不是所有的物质都可溶于水，有些物质必须用其他溶剂溶解到储备液浓度，但可用水稀释到工作浓度。
- 分装的体积。分装后的体积要与最后稀释使用时体积相对应。

你可以在实验程序、手册、论文或同事那里查到物质的工作浓度，但是要确认此工作浓度适合你的实验。

氯霉素可以溶于甲醇或无水乙醇，或低浓度情况下溶于温水，由于甲醇对细胞和细菌的毒性比乙醇高，所以浓储备液用乙醇配制。

2. 决定配成几倍。这是一种在方便和需要之间的折中方法，由于非常少量的物质很难称量，所以可能需要配成你永远也不会使用的浓溶液，10～100 倍是比较好的浓度。
3. 准备好无菌的管子，做好标签。如果要分装的物质必须冷藏，就把管子置于冰上。

要知道物质在水或其他溶剂中的溶解性，可以在外包装、说明书、目录或制造商处查到。手册和其他资源的实验程序通常有描述某种物质储备液的配制方法。

配制 20 mg/ml 的氯霉素储备液，稀释 1000 倍，终浓度为 20 μg/ml。

如果配制 1 L 的培养基，使用 1 ml 储备液即可。

如果配制 100 mL 的培养基，则需要 100 μl 储备液。

4. 配制浓溶液，如果需要，过滤。操作时要在通风橱内操作。
5. 把配好的无菌溶液分装到试管存放在冷藏库或者是合适温度的架子上。
6. 在记录本上做好记录。

配制浓溶液时要计算好比率，1∶1000或1∶100都是比较方便的稀释倍数。

在每根管子上都做好标签，标签应该包括试剂的名称和浓度、配制的日期及配制人的名字。标签必须清晰、明了，使实验室每个人或安全员都能认清。如果架子上或盒子里只有一种溶液，则在架子或盒子上做好标签，每个盒盖上作个分类标签就可以。

冰箱和冷库

- 使用适当的冰箱或冷藏库。如果有放射性物质或生物危害物质存放其中，则严禁放置食物，冰箱门上要作清楚的标记。易燃物质（如乙醇）必须存放在防爆冰箱内，这种冰箱可以消除电火花。
- 只有在取试剂的时候才打开冰箱门。如果要在冰箱内寻找某个试剂，先将放置其他试剂的盒子或架子放在冰上后再找。
- 冰箱或冷藏库内所有容器都必须有标签，盖子都必须盖好，不要将没有拧紧盖子的试管放在冰箱内的聚苯乙烯杯子里或者放鸡蛋的凹槽内。每个管子都必须经受得住摇动而不会从架子上翻落（以防粗心的实验员在冰箱内乱翻东西时将试管打翻）。
- 定期清理那些已经不用的试剂。只剩 10 ml 培养基的瓶子、细菌培养基的皮氏培养皿、以及那些“以备万一”备用的样品，它们会占据许多空间而不容易找到需要的物品。

如果储备液需要过滤除菌，配制时要多配 10%。检查固体药品的包装，因为可能是无菌的，将它溶解在无菌水或乙醇中，就不需要过滤除菌了。

- 把所有试剂放置的位置记录下来。这样做能迅速地在盒子里找出试剂，并且在稍后能放回原处。把试剂放置的位置系统的记录下来，能够使寻找试剂变得更加容易。
- 尊重私人空间。冰箱是公用的但通常会一个人一层，因此不要占用别人的位置。当你整理好自己的东西，发现地方还是不够时，和管理冰箱的人讲，让他给你更多的地方。

无霜冷柜，无霜冷柜一般不用来存放酶和生长因子等对温度变化敏感的试剂。因为这种冰箱温度循环比较缓慢，以防止霜的形成。

无霜冰箱，冰箱应当使用无霜的以防止水分的损失。

☆ 怎样除霜

为实验室的冰箱除霜是一项工作，需要全实验室人员的协作和互助。这需要花费1～3天，把冰箱内的东西全部拿出来、除霜、清洗、直到冰箱再度冷却后把东西全放回去。

- 除霜工作应该提前一个星期做计划。必须通知所有实验室成员，哪天、什么时间他们应该将所有的试剂从冰箱中拿出来。最好是给大家准备一个空的冰

在低温冰箱中是很难找到空余位置的，因为这种冰箱通常是被塞的满满的，所以环境健康与安全部门常常准备一个“后备”的低温冰箱，以防备紧急情况或短期保存。所以一定要知道它放在哪里，以防万一。

箱，否则每个人必须找一个冷一点的地方放置药品。

- 除霜前的清理是丢弃无用试剂的好时机。每个人都应该丢弃那些过期或是永远也用不到的试剂，检查所有试管并重新整理记录。
- 仔细地把所有试管包好，不论走多短的距离。不要把管子放在那些容易滑落的地方，每个盒子和容器都要做好标签，千万不要根据放置位置来识别试剂。
- 除霜要在上午尽可能早的时候开始。不要过夜，因为会产生大量的水，从而必须有人整夜守着，拔掉插头，打开门。
- 戴好手套除冰。中等厚度的橡胶手套（如洗碗用的）可以保护手不被冻伤，以及不被冻在冰箱内的杂物弄伤，但一定要小心那些冻在冰箱里的破碎的试管。
- 备好拖把、木桶、报纸、纸巾、实验台吸水纸和任何可以吸水的东西，还有放置丢弃吸水物的盆。
- 除霜。除霜时不应该用工具去戳冰，可大家却都这样做。如果这样做的话，必须保证冰箱内的冰已经部分融化了且冰层要足够厚，以防止戳破冰箱内壁。但不管怎样，除霜时应尽量用冰铲去铲而不要戳击。
- 用吹风机来加速除霜。不要用吹头发的电吹风，因为有很高的触电危险。可以用一个装满热水的桶来代替，将桶内装满热水，放入冰箱关上门，20 min 后把它拿走即可。也可以洒一些热水到冰箱内，这样做可以加快除霜，但会产生更多的水。
- 除去所有产生的水。除水对于立式冰箱来说是很容易的，因为大部分水会聚集在底面或流到地上，容易用拖把除去。对于卧式的冷柜来说，除去聚集底部的水就不那么容易了，只能用虹吸管或泵等转移出来，也有一些便宜的塑料泵可以使用。
- 保持地面干燥。湿的实验室地板是一个死亡陷阱。
- 把除过霜的冰箱擦干净。用比较温和的消毒剂清洁除好霜的冰箱。
- 等到冰箱完全干了才能插上电源。当然冰箱要恢复到预设温度可能要几个小时甚至一夜，但是一定要等到温度稳定后再把试剂放回去。
- 记录试剂的放置位置。空间可能是由一个人统一管理的，但每个人都必须知道自己的东西放在哪里。

实验室废物的处理

每一张纸、细胞、化学药品、吸管和试管都有不同的丢弃位置，没有什么东西可以随意丢弃。所有的丢弃规则因单位而异，所以要认真听取环境健康与安全部门部门培训指导，询问实验室主要研究人、实验室经理、或实验室的高级主管。丢弃物品时必须小心，这不仅仅是出于安全原因，乱丢垃圾在实验室是要被人骂的。

实验室废物处理须知

- **化学组成**
- **有危害还是无危害**
- **是否有放射性**
- **是否有生物危害**

> 必须与你自己单位的环境健康与安全部门部门核实保存和丢弃的规章制度。

- **是否可以回收利用**。报纸和其他纸张是可以回收的，有些试剂的容器、运输干冰的盒子、放射性物质的外罩包装等也可以回收。每种丢弃的物品都要分场所丢弃。

警告

- 决不能到处乱放放射性废物，哪怕是一分钟。必须放在指定丢弃的位置。
- 不乱丢一些尖锐的物品如针、巴氏管、解剖刀等有生物危害的锋利垃圾。它们必须放置在专门的盒子里，并且要当作有生物危害物品对待。
- 不乱丢碎玻璃，要放在有专门指示的盒子或容器里。如果玻璃沾有生物危害物质，要先高压灭菌后再丢弃。

酸　少量的酸（<100 ml）可以中和后（用 pH 试纸检查）然后缓慢倒入下水道，并用大量水冲洗。但是大量的酸就必须作为危害化学废物处理。

> 酸碱不能混合。

铝箔　回收使用，看看大厅里或系里的垃圾桶。

抗体　作为生物危害废物处理。

细菌　生物危害废物。平板和斜面属于固体生物危害废物；可重复使用的烧瓶和试剂瓶要经高压灭菌处理，或者用 10% 次氯酸钠漂洗；液体培养基在倒入下水道之前，要经高压灭菌处理或 10% 的次氯酸钠处理；细菌培养的上清同样要当作液体培养基处理（包括大肠杆菌处理），须经过灭菌后再倒入下水道。

> 不要灭菌含次氯酸钠的溶液。

碱　少量的碱（<100 ml）可以先中和（用 pH 试纸检查），然后缓慢倒入下水道，并用大量水冲洗。但是大量的碱必须作为化学危害废物处理。

生物危害废物　生物危害废物是指来源于活体或与活体有关的物体的废物，它可能是液体的也可能是固体的。

> 不能把 pH<3 或 pH>9 的液体放在金属容器中保存，避免腐蚀。

- 液体（>1ml）生物危害废物，加入次氯酸钠至终浓度 10%，放置 30min 后可直接倒入下水道。
- 固体生物危害废物丢入标有生物危害物的桶内。

缓冲液　多数缓冲液可直接倒入下水道，参见“化学危害废料”。

> 把有机和无机废物分开丢弃。

细胞　生物危害废物，液体培养基加入次氯酸钠至终浓度 10% 或经高压灭菌处理后倒入下水道。把一次性的平板、培养皿、试管、试剂瓶等内的液体吸出后，再把它们丢弃到标有固体的有害废物的箱子内。可回收的试剂瓶（在细胞培养中并不常用）要经过加入次氯酸钠至终浓度 10% 处理或经高压灭菌处理。

化学危害废料　通常化学物质是不能混合的，如果混合，仅限于少量的同类溶剂，如所有的卤化溶剂。首先要与环境健康与安全部门部门核实。当然同一过程中的溶液是可以混合的，如 DNA 合成仪中出来的溶液、DNA 抽提中的溶液（酚-氯仿混合液）。

> 不要把易燃的、与水不溶的、与水反应的或高毒性的物质倒入下水道。

所有的试剂瓶上都必须有标签，化学药品的名称、混合物的浓度、废液的体积、位

置以及你的名字。

要使用正确的试剂瓶，不能随手拿起实验室的一个空瓶就把废液倒进去，这样做可能有爆炸、起火和泄漏的危险。询问环境健康与安全部门部门来选择正确的试剂瓶和瓶盖。装化学废料的瓶子要参考环境和健康和安全部门的规定，少量溶液最好先中和，最好能测量一下废液的 pH 值。参考环境健康与安全部门部门的规定，把 pH 值调整到合适的值。

- 有害化学废物的例子

乙腈、丙烯酰胺、苯、氯仿、铬酸、溴化氰、二异丙基氟磷酸（DFP）、过氧化氢、二乙醚、二甲替甲酰胺（DMF），二甲基亚砜（DMSO）、溴化乙锭（EB）、甲醛、肼、氢氟酸、氰氢酸、水银、二氯甲烷、甲基汞的氢氧化物（Methylmercuric hydroxide）、四氧化锇、高氯酸、高乙酸、酚、嘧啶、三氯乙烯、二甲苯等等。

没有危害的化学废物 固体废物当垃圾丢掉，液体废物直接倒入水槽的下水道，并用大量水冲洗。

- 有机试剂

醋酸盐：Ca、Na、NH_4 和 K 盐

氨基酸及氨基酸盐

柠檬酸及其 Na、K、Mg、Ca 和 NH_4 盐

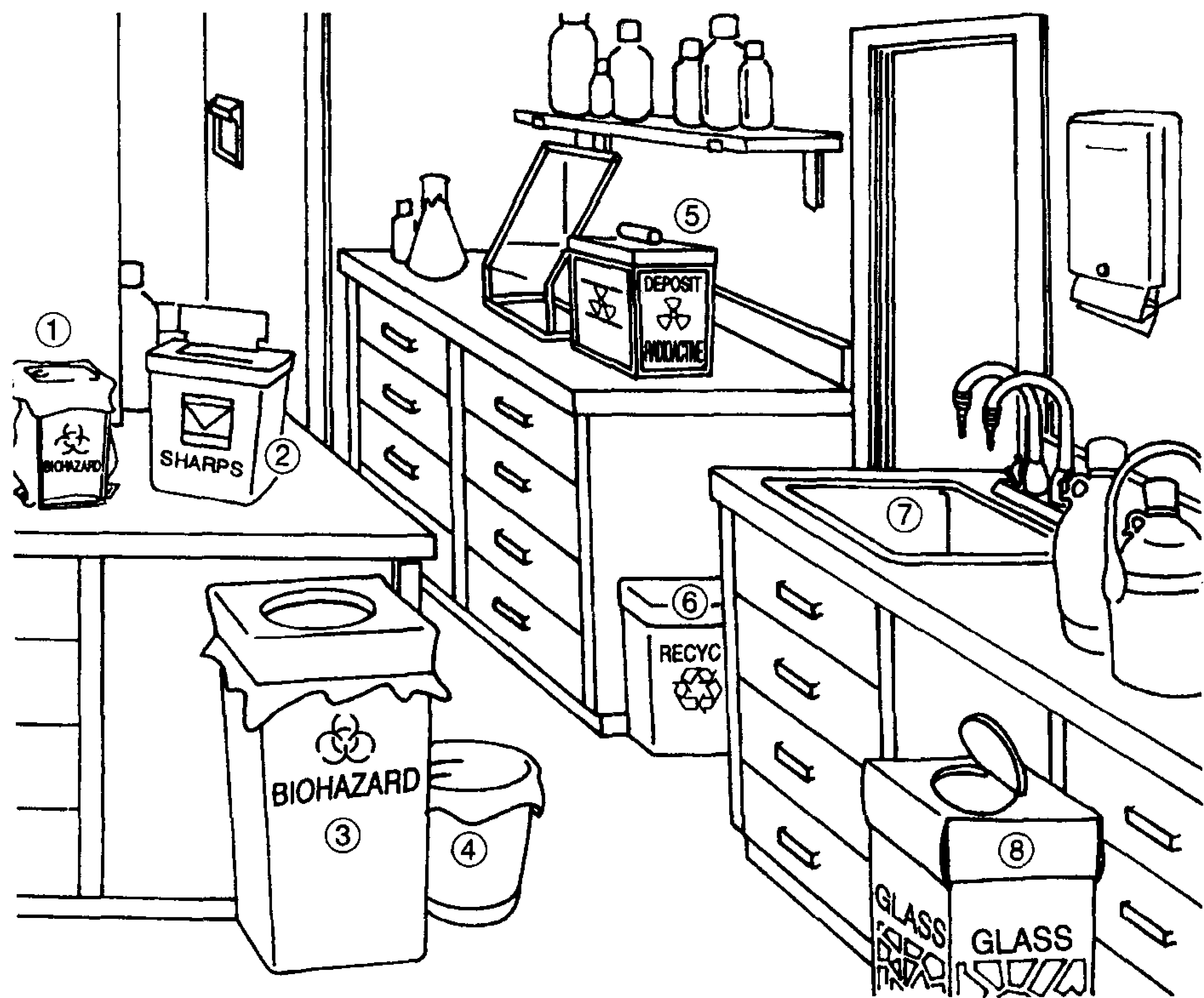


图 8-3 实验室到处可见的废物丢弃区

多数实验室有危害物质堆放区：①实验台上的生物危害箱；②锋利物品丢弃箱；③大型生物危害废物箱；④垃圾桶；⑤放射性废物；⑥回收废纸；⑦水槽；⑧玻璃丢弃箱。

乳酸及其 Na、K、Mg、Ca 和 NH_4 盐

- 无机试剂

碳酸氢的 Na 和 K 盐
硼酸的 Na、K、Mg 和 Ca 盐
溴化 Na、K 盐
碳酸：Na、K、Mg 和 Ca 盐
氯化 Na、K、Mg 和 Ca 盐
氟化钠
碘化 Na 和 K 盐
B、Mg、Ca、Al、Si 和 Fe 的氧化物
Na、K、Mg、Ca、NH_4 的磷酸盐
Na、K、Mg、Ca 的硅酸盐
Na、K、Mg、Ca 和 NH_4 的硫酸盐

> 非可燃的、无腐蚀性、不含金属的、没有毒性的、无气味的可溶废料可直接倒入下水道，多数缓冲液也可这样做。

DNA 生物危害物质。

干冰 让干冰在冰盒或容器内蒸发，不要直接倒入水槽，即使在冲水时也不要这样做，因为下水管会被冻裂。

凝胶 生物危害物质。

玻璃 放在一个密闭的有标签的盒子内丢弃，高压灭菌处理。多数实验室有专门的玻璃处理箱。

手套 如果使用手套接触了有生物危害的物质，当作固体生物危害废品处理，其他的直接当垃圾弃掉。

针头 放入专门盛尖锐废物的废物箱。

> 不要把针头从针套拿出来，这样做很容易出危险！把针头带着针套一起丢到装锋利废物的盒子里。

纸张 可回收的纸张放在实验室专门的回收箱中，不能回收的如纸巾等则当作垃圾丢弃。

酚和含酚的溶液 有害化学废物。在实验台上准备一个专门的瓶子，当装满废液后，标好酚及其他试剂如氯仿和异戊醇的浓度。使用环境健康与安全部门部门推荐的瓶子，不要使用一般的瓶子。

照片的定影液、显影液和停显液 可以稀释后直接弃入下水道或按环境健康和安全部门的要求分别回收。

吸管 一次性吸管通常当作生物危害废物直接丢弃，但是吸管可能会扎坏垃圾袋，所以一般都使用两层袋子以防止伤到人。通常实验中都会有一个专门放置吸管的盒子，可回收的吸管放在专门的桶内，拿到专门的清洗机上清洗。由于这样会产生气溶胶，所以要用棉花塞住口，再放入一个水平的废物容器中。

> 不要把挥发性的化学药品，如氯仿随意的丢在通风橱或实验台上。把它当作有害的化学废物处理。

蛋白质、细胞抽提物 属于生物危害物质。

放射性废物 包括所有与放射性物质接触过的实验物品，如纸巾、吸水纸、吸管等。

RNA 生物危害物质。

血清 生物危害物质。

尖利物 将巴氏管、针、带针头的注射器、吸头、载玻片、盖玻片、刮胡刀、解剖刀等放入专门放置尖利物的箱子内。不同的实验室有不同的处置法，如可以把普通和生物危害物质分开放置，但是接触了放射性物质的尖利物品必须另外放置。

不要把针头从针管中拿下来，把针头带着针管一起丢到装锋利废物的盒子里。

溶剂 化学危害废料——不能直接倒入下水道，用一个和废液差不多容积的容器盛装废物。不要混合不同的试剂，当然有些已经是混合物了。

对于人工合成的化学物质以及在实验过程产生的混合溶液，在丢弃前把它们分为
- 卤代物（如二氯甲烷、二氯乙烷、氯仿）
- 易燃物（如甲苯、二甲苯、苯）
- 水溶液（如 HPLC 的废液、氨基酸分析的废液）
- 酚-氯仿混合物

上清 离心细胞、病毒和细菌等培养物的上清为生物危害废液，这些废液须经高温灭菌处理或加入次氯酸钠（终浓度 10%）处理后再倒入下水道，离心时要准备一个试剂瓶专门收集这些上清，不能直接倒入下水道。

注射器 带有针头的注射器，按照生物危害废物处理。不带针头的也可以丢弃在专门放置固体有害生物废物的箱子内，参考环境健康与安全部门部门的规定。

不要将移液头扔到固体生物危害废物中或垃圾中，因为移液头被认为是尖利物品，它们会戳穿生物危害废物包而泄漏包内物品。

温度计 水银温度计不能当作废玻璃一样处理，大多数水银温度计在打碎时用塑料或树脂包裹住水银，如果这层保护没有被破坏时，用手（带手套）将它放到一个密封的盒子或烧瓶中，交给环境健康与安全部门部门处理。如果水银流出来，要立刻联系环境健康与安全部门部门处理。酒精和煤油温度计则可当作废玻璃而直接丢掉。

吸头 丢到尖锐废品箱中。

垃圾 垃圾包括非回收的、无放射性的、无生物危害的、不锋利的、无危害的废物。但实验室中这样的东西不多，大部分是纸巾。这样的垃圾通常用绿色或黑色垃圾袋盛装，切记不能在实验室内吃东西，实验垃圾中不应包括这样的生活垃圾，而且这种行为也是环境健康和安全部门所不允许的，所以苏打水罐及三明治的包装袋等都应丢弃在实验室外。

注意值日送走废物的时间。每个实验室都有安排值日，打扫垃圾，这是每个人都应该做的（即使是新来的人员也不能例外）。值日的安排一般是轮流的，所以不要忘掉你值日的时间。

挥发性的化学物质 处理丢弃挥发性的化学物质要根据它们的组成（危害性的、有机的等等）来进行，不要让这些挥发性物质在通风橱内挥发。

处理的优先顺序

实验室的废物要立即分成几类，它有可能是存在生物危害的、或是既有生物危害又

有放射性的、亦或是既有生物危害又有放射性而且还是有机的溶液。处理实验室废物时根据下列优先顺序进行：

1. 放射性，固体；
2. 放射性，液体；
3. 化学危害废物；
4. 生物危害废物；
5. 尖利物品；
6. 无害的化学药品。

(郝肇菁　王维荣　黄伟达)

参考文献

Collins C.H., Lyne P.M., and Grange J.M. 1995. *Microbiological methods,* 7th edition. Butterworth-Heinemann, Oxford.

Fisher Safety Products Reference Manual. 2000. Fisher Scientific, Pittsburgh. http://www.fishersci.com/safety/safe_his.jsp

Gershey E.L., Party E., and Wilkerson A. 1991. *Laboratory safety in practice: A comprehensive compliance program and safety manual.* Van Nostrand Reinhold, New York.

Harlow E. and Lane D. 1999. *Using antibodies. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Kowahl V.C. 2004. *Laboratory survival manual.* Office of Environmental Health and Safety, University of Virginia. http://keats.admin.virginia.edu/lsm/home.html

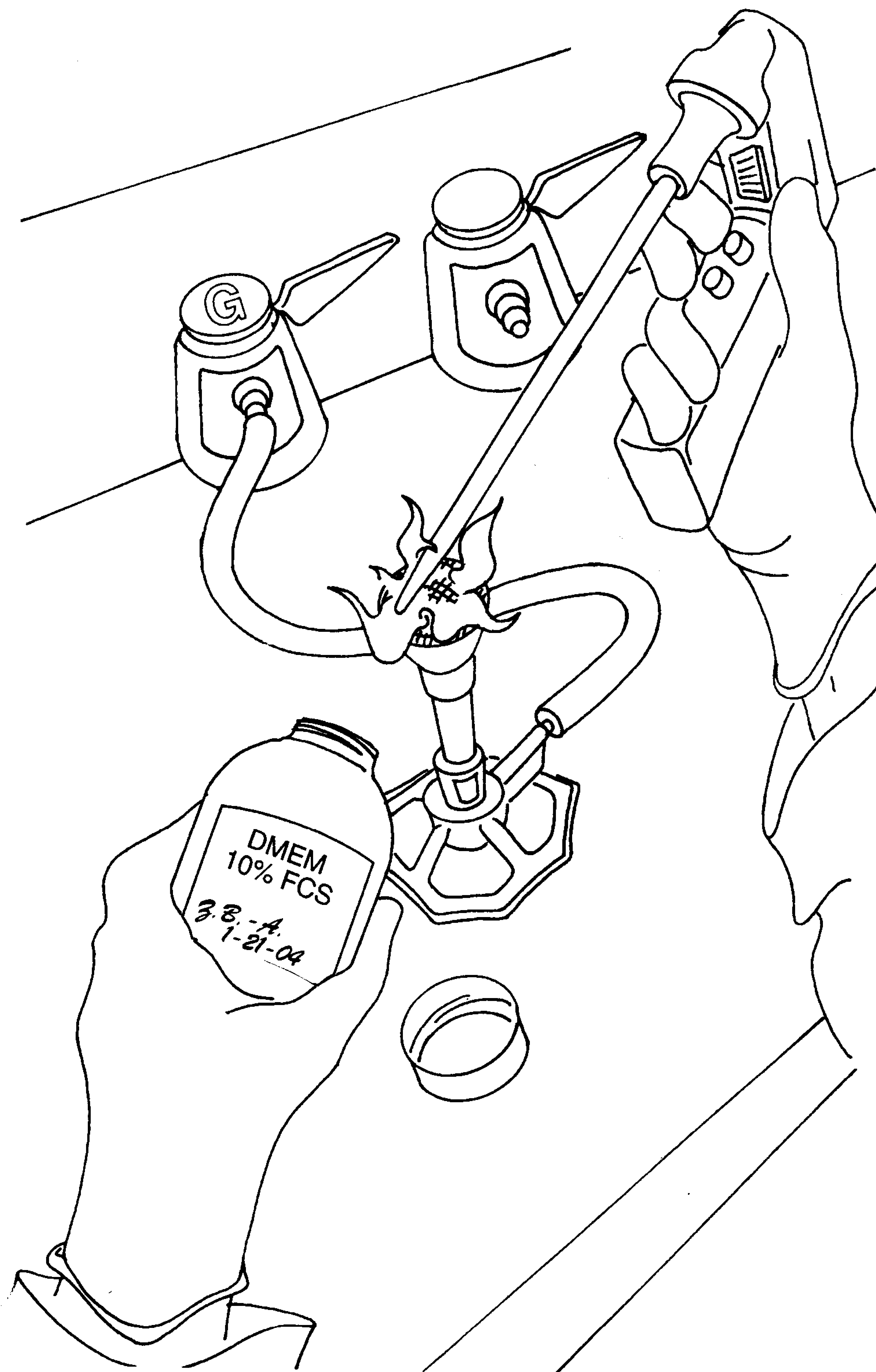
Laboratory Safety Guidelines, 2nd edition. 1996. Population and Public Health Branch, Health Canada. http://www.hc-sc.gc.ca/pphb-dgspsp/publicat/lbg-ldmbl-96/lbgc_e.html

Lenga R.E., ed. 1988. *The Sigma-Aldrich library of chemical safety data,* edition II, vol. I and II. Sigma-Aldrich Corporation, Milwaukee.

MSDS Search Databases http://www.msdssearch.com

O'Neil M.J., Smith A., Heckelman P.E., Obenchain J.R., Gallipeau J.R., and D'Arecca A., eds. 2001. *Merck index: An encyclopedia of chemicals, drugs, & biologicals,* 13th edition. Merck and Co., Rahway, New Jersey.

The Merck Index Online http://library.dialog.com/bluesheets/html/bl0304.html


G
DMEM
10% FCS
Z.B.-A.
1-21-04

第 9 章　无菌技术操作

无菌技术是保持无菌状态的操作技术。在通风橱出现以前，所有的无菌操作都是在实验室的实验台上完成的，现在多数的实验室，无菌操作也不再严格地训练，事实上许多分子生物学实验室都不进行无菌操作。

大错特错！虽然在生物化学实验室中无菌操作不象在细胞生物学实验室或传染病实验室中显得那么重要，但是如果在生物化学实验室中也能进行无菌操作则可避免许多麻烦。现在对不同研究领域的区分也不那么明显，分子生物学只是作为一项技术或是手段，而不再作为一个领域，无论什么实验室的实验人员都要培养细胞和冷冻细菌。

无菌操作技术对你来说不仅仅是在无菌的条件下打开你的培养物，而是要当作一项实验中经常考虑和实际操作的技术，这样做才能保证实验中的每项工作都会受益。利用无菌操作技术配制 RNA 缓冲液、做限制性酶切反应以及制备膜蛋白等。当你习惯了无菌操作后，同样可以进行放射性同位素或生物危害药品的实验。

下述所有操作过程都是针对右手工作者的。

什么时候使用无菌技术

☆ **当必须进行无菌操作时**。无论什么时候在进行活的有机体实验或是为进行活体实验而准备培养基、缓冲液、培养容器等时，**必须**使用无菌操作技术，例如：

- 准备转化用的大肠杆菌培养物
- 制备 LB 平板培养基
- 分装细胞
- 过滤培养基的血清
- 打开和溶解冻干细菌

☆ **在无菌操作有帮助的情况下**。无论何时你不想一个容器或是区域中的物质进入另一个容器或是区域时，你应该使用无菌操作。无菌操作对于实验室中的许多操作都适用，即使在操作那些高盐和/或去污剂等不会长菌的缓冲液时，也要小心不要把手上或者移液头上的油脂和灰尘混入溶液中。

在操作有害制剂时，如放射性物质或有毒物质，你应该使用无菌操作。这样做首先是出于保护自己。有时你必须改变一些实验操作过程，在你和试剂之间建立一个屏障起到既可以保护自身，又可以保护试剂的作用，例如：

- **进行限制性酶切反应**。限制性酶的污染是一个大灾难，虽然大部分酶是保存在甘油中，而且甘油浓度大于 50％时通常是不会长菌的，但在稀释酶和进行没有甘油参与的操作时存在潜在污染的可能性，而且微量的常见元素的污染也会抑制酶的活性。
- **进行 PCR 反应**。PCR 反应中其他 DNA 的掺入会导致灾难性的后果。进行 PCR 反应时要使用无菌操作技术，而且不在有 PCR 仪或进行 PCR 反应产物分析的房间内操

作可以避免偶尔的 DNA 污染。

- **利用^{32}P 磷酸盐标记细胞。**这种情形下，使用无菌操作技术是出于对自身的保护，而不是出于保护细胞。出于无菌考虑，不应让盖子一直敞开、不能让气雾产生以及不要使用已经用过的移液管。

无菌技术

空气中布满了灰尘、孢子、细菌，你不愿意它们掉入你的试剂瓶及细胞中。除非用气流吹走它们，否则这些潜在的污染源就有可能掉在你的工作区域、试剂瓶或吸头上。微生物可能会从你手上或是袖子上掉下来。手臂的挥动、快速地吹打以及有人走过都可能扬起那些未知的污染物。

> 尽量保持桌面清洁，瓶口关闭以及最少的活动。

使用无菌操作技术将使你的材料受污染的机会减到最小，虽然不可能在所有情况下都保证绝对的安全，避免所有的污染，但是你的实验技术越好，污染的概率也越低。

规则

- **工作区域尽可能地远离通风口和交通口。**不应该开窗工作，也不要靠近门口。通风橱能够帮助无菌状态的保持，但它也不一定。
- **确保整洁的工作环境。**拿走所有不用的仪器和设备，旧容器和箱子也不要放在近处，做完实验后，收拾干净实验台。
- **实验前用消毒剂或是清洁剂清洁工作区域。**70％的乙醇是最常用的（但也要根据不同实验室的情况决定，因为酒精不一定对那些特殊的污染物有效），在每天实验之前和结束之后都要用 70％的乙醇清洁实验台台面。
- **所有用到的移液头和试剂瓶都必须是无菌的。**不知道是不是无菌的器材是不应使用的，可反复使用的试剂瓶和移液头盒子等必须标明是否已经经过高压灭菌。一次性的移液头必须保存在已灭菌的盒子内，那些装在已经破旧的盒子内的移液头不能继续使用。
- **工作区间内尽量减少手臂的运动。**把有用的实验工具或是仪器尽可能放在手边，右手用的应该放在右手边，左手用的放在左手边。例如，一个右手工作者要从一个瓶内吸取微量的液体，则移液辅助器、移液头和移液器都应放在右手，而试剂瓶应放在左手边。
- **把所有可能用到的东西都准备好。**这样做可以保证实验过程中不会因为没有拿出某种试剂而不得不离开实验区域，人的走动很容易扬起灰尘，并且使人不能集中精神。
- **戴好乳胶手套并及时更换。**因为手套不仅可以保护实验人员的双手，而且还能保护试剂。如果手套不是必须的，那么实验前后必须洗手。虽然在操作那些无毒和非致病性物质时，不戴手套可能会比较方便，但是对于许多操作，手套都是必须的。

技术技巧

做不同的实验，操作上可能会有小小的不同，而且不可能每个动作都被描述，所以实验时必须注意自己的动作。通常你所要注意的就是每项操作时都要尽可能减少污染的可能性，所以动作要尽量减少。

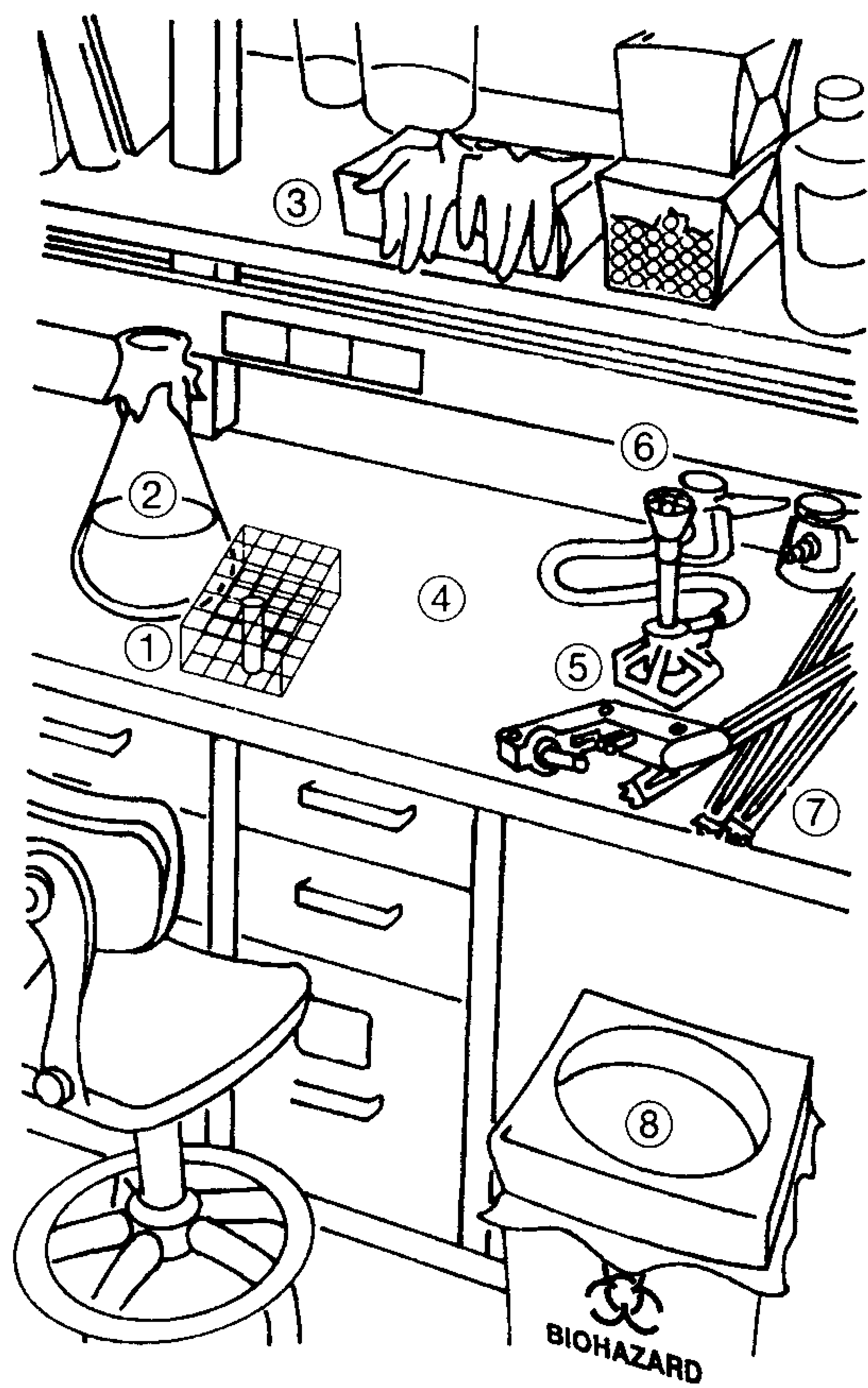


图 9-1　无菌操作时的实验台布置

任务是将 5ml 正在生长的细菌培养物转移到 100 ml 的培养基中。图示的设备是为右手工作者布置的，所有右手使用的仪器均放置到右手处，左手使用的放置到左手处。①细菌培养物的试管，排放在试管架上；②装培养基的烧瓶；③手套盒；④洁净区域；⑤移液辅助器；⑥本生灯；⑦单独包装的移液管；⑧生物危害物丢弃箱

- **最小化：**

距离，尽量将所需要的物品放在离手最近的地方。距离越近，移动就越少。

暴露，在空气中移动物品的时间越长，接触空气中微粒的概率则越大。试剂瓶敞口在空气中的时间越长，掉落进去的空气中的微粒越多。灼烧一下瓶口和移液管，使颗粒固定在表面和制造一个向上的气流，都可以减少掉落颗粒的数量。

> 灼烧不是为了灭菌，只需在火焰上燎 1～3 秒即可。

移动，移动可以引起空气的流动。移动越快产生的流动也越快，所以只能慢慢地做那些必要的动作，而不能在空气中挥动移液管，也不要在工作区内交叉你的双手。

灌注，灌注会产生气溶胶，还会混入空气和一些未知的污染物，而且那些残留在瓶口的液体由于能够接触外界成为重要的污染源。无论何时，如果可能的话，转移液体时只使用移液管。

> 移液管可以用来转移最多 50 ml 的液体，使用时要确保移液管固定在移液辅助器上，50 ml 的移液管比较大，如果没有固定好就会漏气，操作时会有液滴流下。

- **保持试剂瓶与桌面成大约 45°角时打开盖子。**这样可以尽量减少空气的污染以及在移液时产生最少的气溶胶。
- **如果必须取下盖子，那么要把它倒放在干净的台面上。**尽量不要这样做，向上放的盖子会有更多的机会造成污染。
- **使用玻璃的移液管及打开试剂瓶时都要用火烧一下。**本生灯要放置在手和试剂瓶之间。

> 试剂瓶盖的放法有两种观点，正放和反放，这两种都是可行的，选一种就可以。如果你的盖子是反着放，那么确保你的手不要从上方经过，正着放时要保证桌面是干净的。

- **塑料的试剂瓶和移液管不能用火烧。**不论是否用火烧过，打开瓶口时都要迅速，并且开口尽可能的小，移液时要使试剂瓶保持 45°角。
- **轻轻地吸取液体，不要旋转试剂瓶。**这样做可以尽量减少气溶胶，打开离心瓶时也要小心。
- **不要让试剂瓶保持开口状态。**使用完任何一个试剂瓶时要立即盖上盖子，不要把移液管放在开口的试剂瓶内。
- **停下你手中的工作。**由于无菌操作中有许多过渡的操作，实验才能做好。放松但要时刻保持警惕，防止一些常见错误的发生。

无菌操作中的一些错误

1. 液体吸取过多时。丢弃移液头，检查移液器，可能要更换过滤器。
2. 当移液头接触到试剂瓶外侧、底部或移液管盒外壁等其他固体物时，弃掉移液头。
3. 开口的移液头盒或试管掉到地上，丢掉它们。
4. 当手（即使是戴着手套）等物体接触了那些避免微粒进入的 HEPA 过滤器时，这些过滤器要丢弃，因为这是一个严重的污染途径。
5. 重复使用了移液管。当移液管已经被浸湿时，更容易被空气污染。

移液

☆ 使用可重复使用的玻璃移液管

可重复使用的移液管通常放置在金属桶中。要用于细胞或细菌实验，移液管必须用棉花塞住。

> 小桶的盖子用左手的最后两个手指打开和夹住。

1. 将小桶的盖子拧松。

2. 左手拿住小桶，右手卸掉盖子。

3. 用火烧一下盖子和小桶的开口处，把盖子放在小桶的旁边。

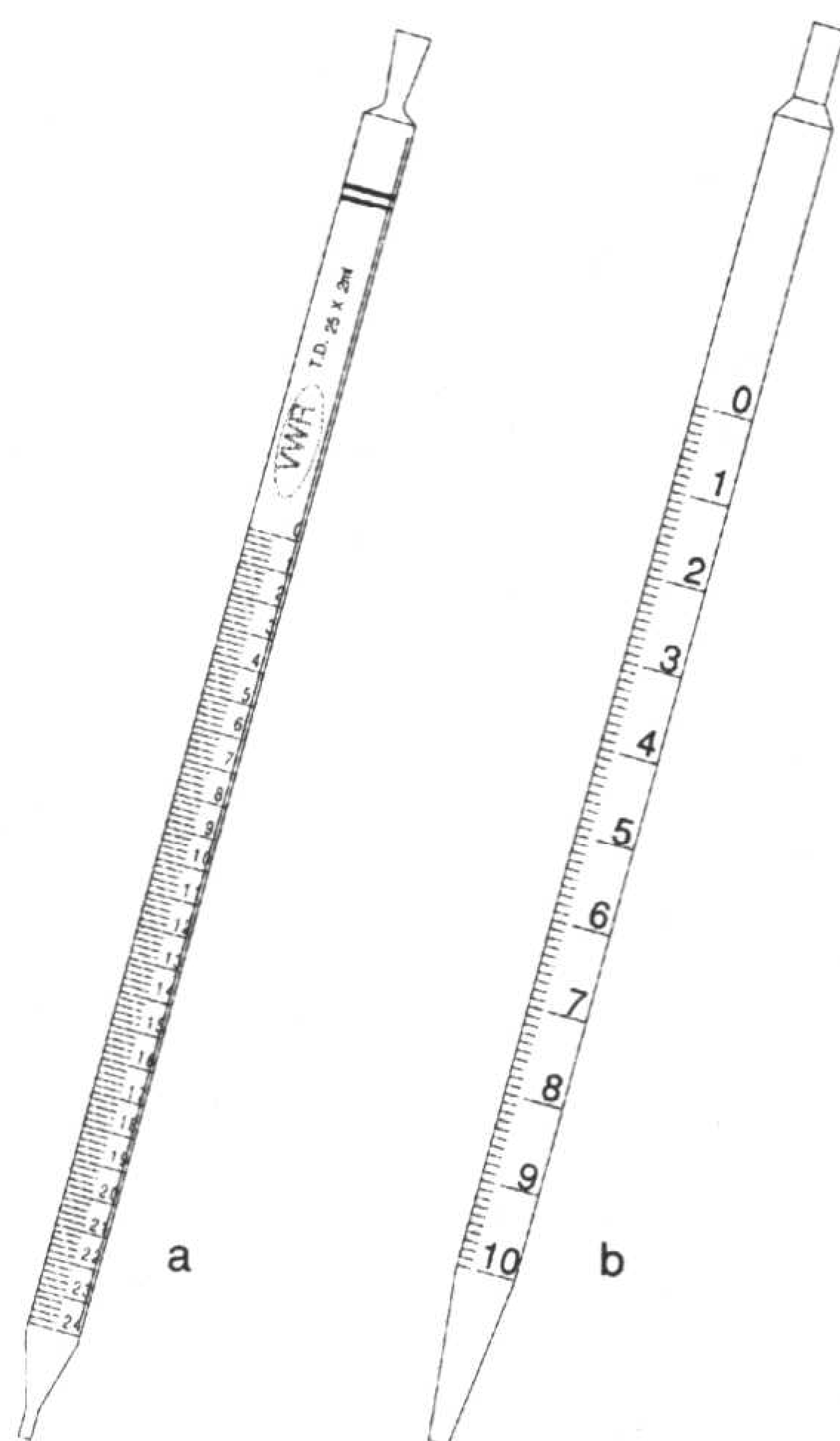


图 9-2　仔细检查移液管上的刻度类型

a. 多数移液管直接完全释放（顶部标有 T.D. 表示释放）移液管中所吸取的体积；

b. 标有 T.C.（意为含有）的移液管表示液体释放到的刻度为所移取的体积。

4. 左手水平拿好小桶，轻轻摇动，使一两根移液管的头部露出一点，方便抓取。

5. 取出一根移液管，把小桶放好。拿出移液管时要用拇指和食指捏住距管口 2 英寸处，慢慢从小桶中拿出，注意不要接触桶壁。

6. 用火焰烧一下移液管下部的三分之一长度约 1～3 秒，旋转 180°后再同样操作一次。

7. 把移液管插到移液辅助器中。

8. 用左手拿好要移液的烧瓶或试管，并且倾斜 45°，右手拿好移液辅助器，并且用右手剩下的两个手指打开并夹住试剂瓶或试管的盖子。

9. 左手拿着试剂瓶，瓶口在火上烧一下。

10. 将移液管再在火上烧一下。

11. 将移液管小心的插入液面一下，不要接触内壁，吸取液体后再慢慢的移出。

12. 用火再烧一下瓶口，盖好盖子，放到一边。

13. 在进行 12 步时要拿住移液器，再按7～9的操作将目的容器打开。

14. 按步骤 11 操作。将移液管小心的插入目的容器，放出液体。

15. 拔出移液管并把移液管放在一边。通常会用一个广口瓶临时放置用过的移液管，实验完成后再把移液管浸泡在盆里。

16. 烧一下目的容器的瓶口，盖好并放在一边。

所有的移液操作都是类似的，只是在个别步骤上有所改进。

> 在抽出移液管的时候，手指经常会接触到包装内移液管的顶端，这样移液管一旦接触到其他移液管的顶端就会被污染。

☆ 使用一次性移液管

1. 先把塑料外包装的顶部撕开，这样可以很迅速地取出移液管。

2. 左手拿住包装，用右手的大拇指和食指捏住顶端（移液管的尖端尽量不要接触包装内壁和其他的移液管），并且用手轻轻地挤压包装袋，慢慢抽出移液管。

3. 把移液管的包装放在左边。

4. 所有移液操作与可重复使用的移液管的操作相同，只是不要用火焰加热。

如何打开单独包装的移液管

1. 左手拿住包装袋，手指拿在距顶端 1/4 处，尖端向左。
2. 手指捏紧，使包装不能滑动。
3. 右手捏住包装的顶端。
4. 左手紧紧捏住移液管，右手拉住包装向下拉破包装袋。

5. 继续向下拉包装袋直到移液管露出 2 英寸左右，把包装袋叠起来，这样就拉出了一个无菌的通道可以取出移液管。
6. 将移液管与右手握住的移液辅助器相连。
7. 小心拉出移液管，不要接触到任何外表面，将包装袋放在左边，移液后作丢弃处理。

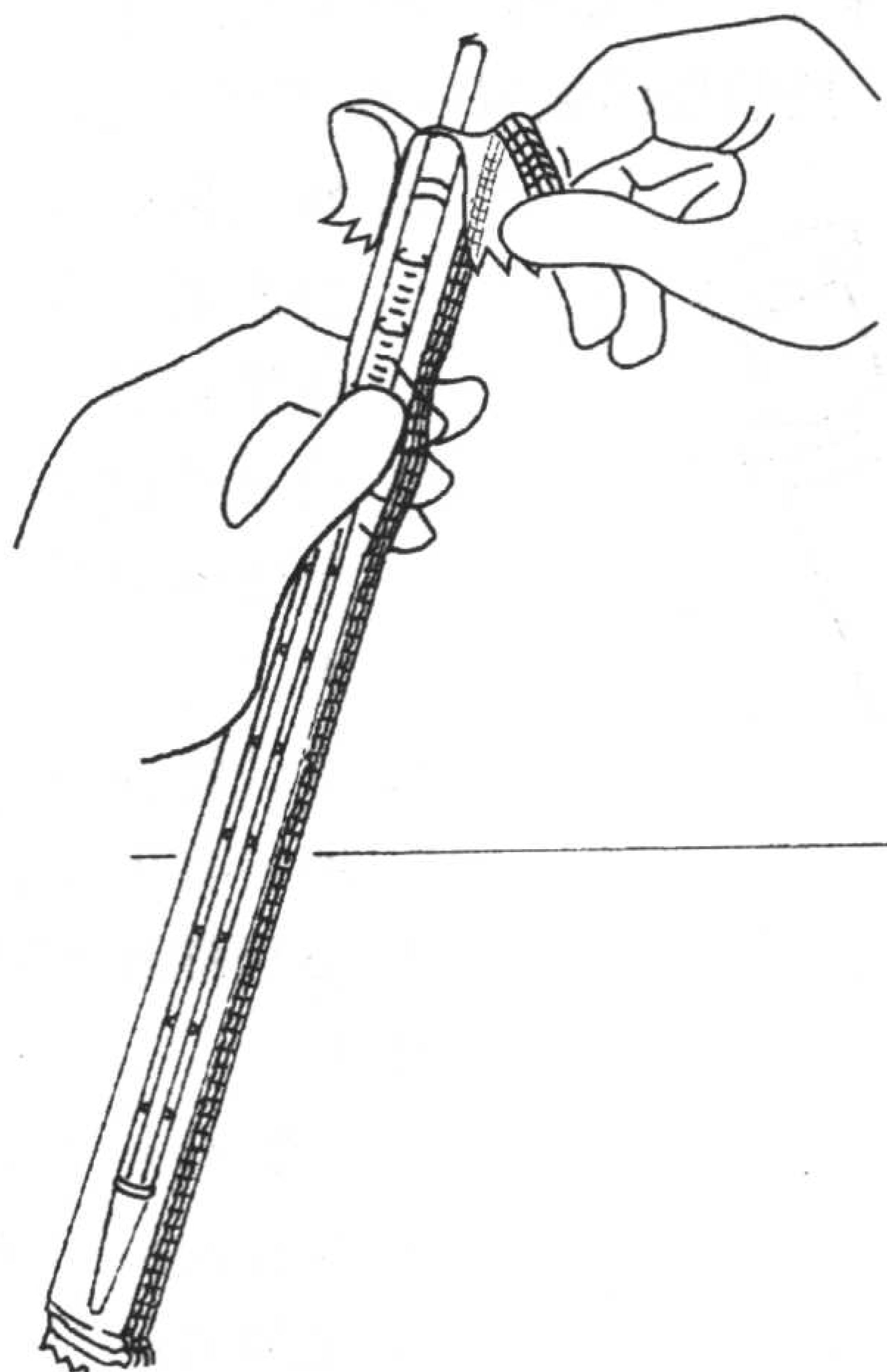


图 9-3 打开一个一次性的移液管

倒灌

左手拿接受容器，右手拿供液容器。

1. 用火烧一下接受容器的开口，并且在火焰旁边保持一定的角度。
2. 用火烧一下供液容器的开口，并在火焰上烧 1～2 秒，不要烧糊液体。
3. 将供液容器放在距接受容器上方 2 英寸处，并使二者成适当的夹角。
4. 倾斜瓶子并倒出溶液。
5. 倒完后用火分别烧一下两个瓶口。

由于倒灌比移液要更容易产生污染，所以只有在转移大量的溶液时才使用倒灌这种操作。

过滤除菌

☆ 用注射式过滤器过滤少量溶液

材料

- 一次性 0.2 μm 的滤器。
- 相应体积的注射器（1 ml、2 ml、5 ml、10 ml 或 20 ml，50 ml 的注射器徒手操作比较困难），使用灭菌或一次性注射器。
- 使用无菌的管子作为接受容器。

• 试管架。

1. 仅撕开滤器的上包装，即较粗的一端，可以插在注射器的顶端。

2. 将注射器从包装中拿出，把推杆抽出，放置在清洁的台面。

3. 将注射器顶端的保护头拿下，立即插在滤器上，注意不要把滤器拿出包装，把装好的装置放在清洁的台面。

> 也可以先用注射器直接把液体抽上来后再装上滤器，但通常注射器插不进已装液体的容器中。

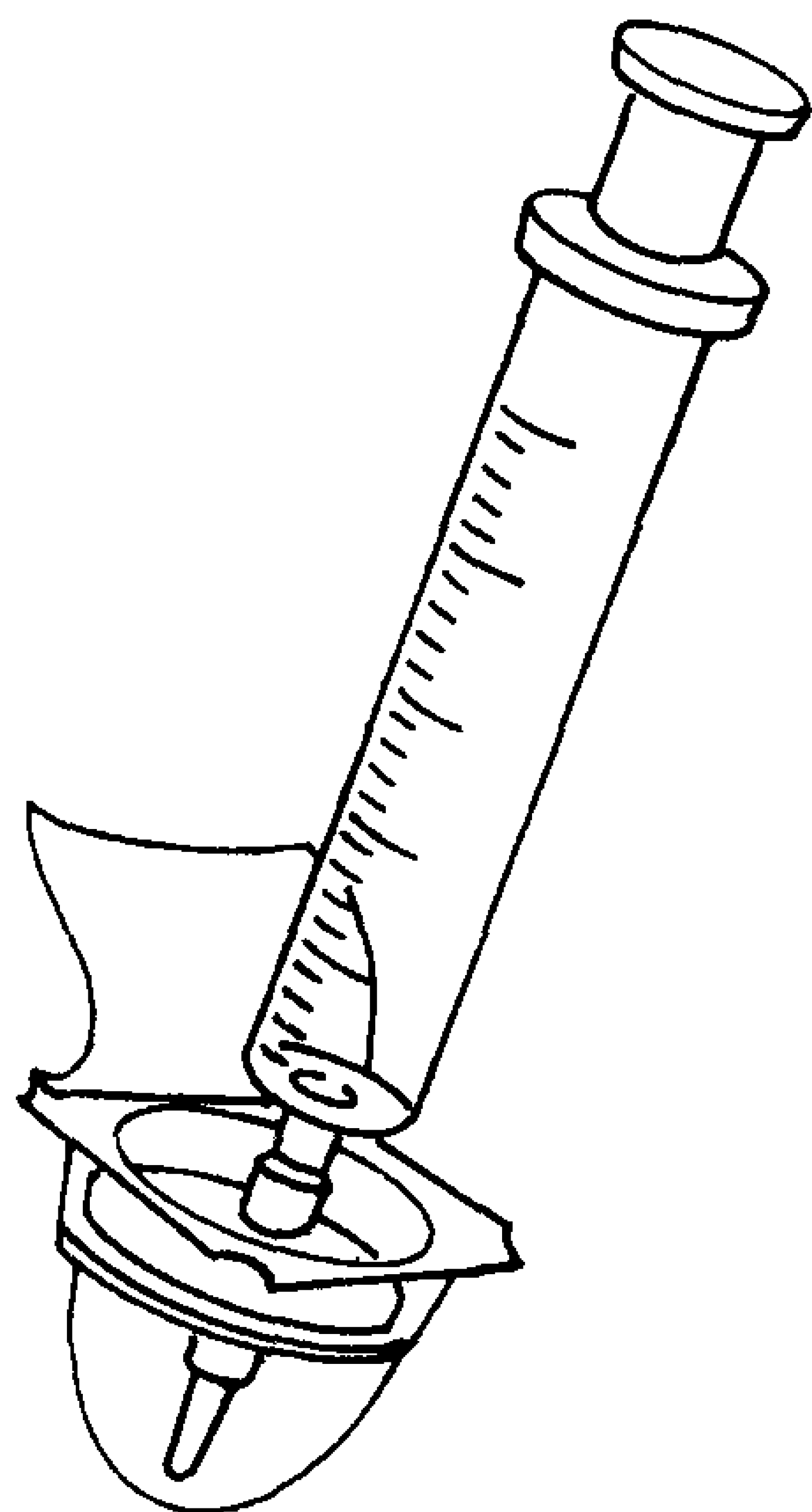


图 9-4 在准备好操作前把滤器保留在包装内

4. 将灭菌的管子打开盖子，放在试管架上。

5. 将滤器从包装中拿出，放入试管中，拿住注射器，保持竖直状态。

6. 将液体倒入注射器中，插回推杆，用力但要慢慢地使液体流经滤器后流入试管内。

7. 将试管盖好，做好标签，将注射器丢弃到装有生物危害的尖利物垃圾箱内。

☆ 使用杯状滤器过滤大体积的溶液

材料

• 一次性 0.2 μm 的滤器。

• 放置滤器的铁架台或架子。

• 无菌的试剂瓶用来装过滤后的溶液。

• 真空器，实验台上见到的家用真空泵是最常用的设备，这种设备是用水或泵驱动的。

1. 将滤器和真空泵用软管相连，滤器用夹子固定在架子上，保持竖直和稳定。

2. 将溶液倒入滤器，溶液体积大时可以分批次将液体倒入滤器。

3. 将滤器的盖子盖上，缓慢打开真空泵，溶液会慢慢地从滤器中抽出来。有些滤器可以配上无菌的试剂瓶，这样过滤后的溶液可直接存放在试剂瓶中。

4. 关闭真空泵，等待一会。

5. 从滤器上拔下真空泵的管子，立刻将过滤好的液体倒入一个无菌的试剂瓶保存。如果容器是过滤装置的一部分时，只需先把容器的盖子盖好。

6. 试剂瓶上做好标签，注明已经过滤除菌（FS），弃掉滤器。

> 有一些用来过滤大体积溶液的滤器装置，它们是带有一个可以拆卸的一次性的滤器。将真空泵的橡胶管接到一个无菌的抽滤瓶上，装好 0.2 μm 的滤器，打开真空泵，待所有的液体都滤出后，关闭真空泵，用火烧一下抽滤瓶的开口，再倒入一个无菌的试剂瓶中。

抽气操作

使用抽气移出液体的操作和使用移液器的操作十分类似，同样要收拾好工作区间，但要多出一个容器用来临时放置用过的移液管或吸管。

1. 打开移液管或巴氏管的包装，安装一个到抽气瓶上。

2. 用左手拿住吸管，插入右手拿的橡皮管中。

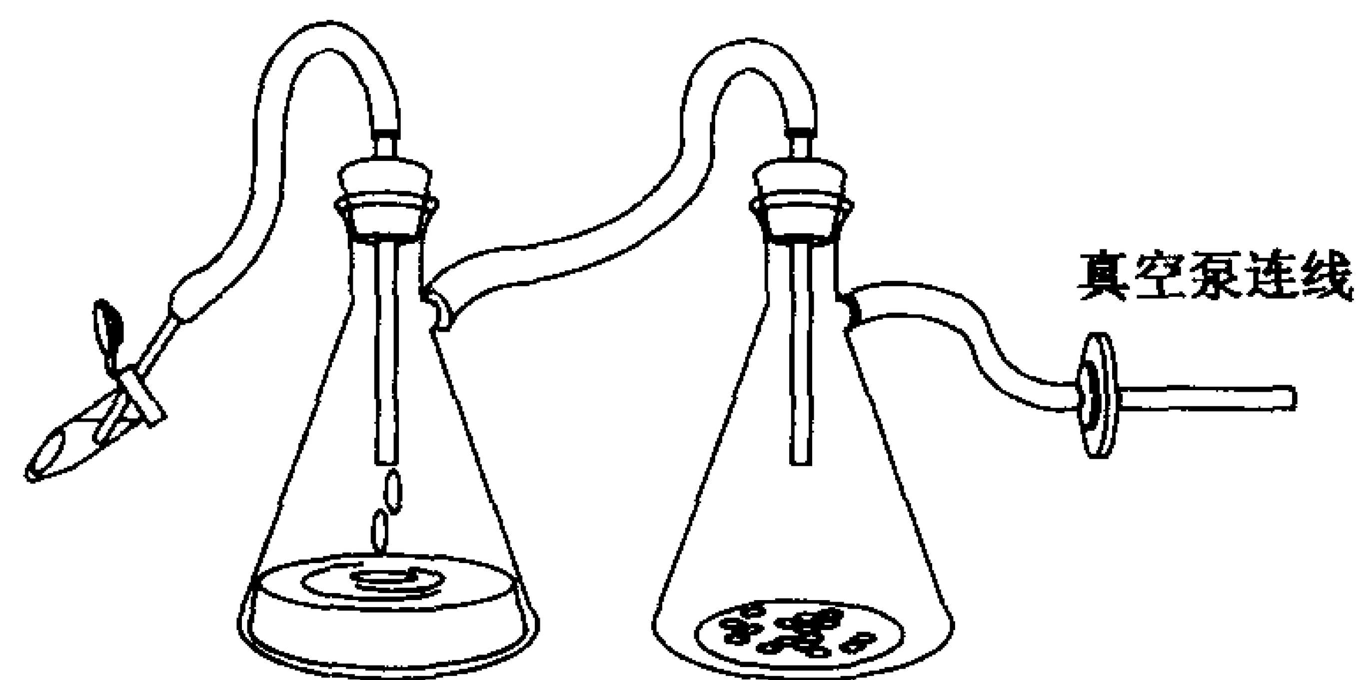


图 9-5 抽气装置

3. 用手握住插入橡皮管的吸管部分。
4. 如果是玻璃的吸管用火稍微的烧一下。
5. 打开真空泵。
6. 打开要吸取液体的试管或容器，同样用右手剩余的两个手指夹住盖子，并把试管或容器保持 45°。
7. 用火焰烧一下试管口。
8. 把吸管头刚好插入液面以下，并随着液面的下降而下降。
9. 快到底部时，稍微抬起一点吸管，使吸管头在沉淀上方附近缓慢移动，直至吸完，但不要碰到沉淀。
10. 将吸管放入事先准备好的容器，以便处理。
11. 将容器口烧一下，盖好。
12. 将容器或试管竖直放置，确认液体已经吸完。
13. 关闭真空泵，取下吸管。

> 由于巴氏管可以插到移液器上，而不用接触火，所以可以在使用前直接从盒子中扎出来。

> 在移液时可以适当倾斜容器，这样做不仅可以避免空气污染，还有助于保持沉淀的完整性。

使用抽气操作有传染性的物质时，必须在抽滤瓶和真空装置之间接上一个盛水的滤器，可以防止那些物质进入真空装置中。当真空度降低时，说明滤器已经被浸湿，必须更换，所以要事先准备好备用的滤器。

保护实验人员

生物医学研究人员的工作中常常会接触一些有潜在传染危险的物质，包括一些感染病毒的细胞、人的血液和排泄物、致病菌等等。根据传播疾病的概率可以把有机体分为几类，有些健康组织也出版了一些在操作这些有生物危害（或潜在的传染危险）的物质时的指导方针。你所在的系所也同样有相关的规定，遵守这些规定不仅是对自己负责，也是对实验室中的其他人员负责。

> “然而，他会重新检查实验程序……按照这种方式，我被引入 *Avery* 的特别僵硬的噬菌体学实验操作技术……他同意会把所有接触到的培养物当作含致病性的培养物。然而通常会犯这样的错误：在对待非致病性的有机物时产生懈怠，影响接下来操作致病性制剂时的技术的运用。”
>
> *McCarty*

表 9-1　根据对实验人员和社会危害程度进行微生物分类的系统

组织	危害程度			
USPHS	Ⅰ级	Ⅱ级	Ⅲ级	Ⅳ级
(1974)	没有或最少	普通的	特别的，对个体	高的，对个体
WHO	风险Ⅰ组	风险Ⅱ组	风险Ⅲ组	风险Ⅳ组
(1979)	对个体低	对个体中等	对个体高	对个体高
	对群体低	对群体低	对群体低	对群体高
ACDP	危害Ⅰ组	危害Ⅱ组	危害Ⅲ组	危害Ⅳ组
(1990)	不可能引起人类疾病	可能对操作者有害，对群体无害	对操作者有害并可能传播	对操作者有很高的伤害，而且有很高的传染性

一些组织还出版了针对操作不同危害程度物质时的指导方针，在美国使用最多的系统是由 USPHS (U. S.Department of Health and Human Services, NIH 的分支机构) 制定的。

生物安全水平的要求

在美国，防范设施的分级为 BL1、BL2、BL3 和 BL4，BL 代表生物安全水平保护。他们有时也用 P1、P2、P3 和 P4 表示，其中 P 是保护的缩写。USPHS 对微生物的危害分类分级中的Ⅰ级是需要 BL1 级的防范设施，依此类推，Ⅲ级的有机体需要 BL3 级的安全保护。

一些程序上的要求可能会影响有机体实际的危害程度，一些裂坏性的处理如超声可能产生气溶胶，从而提高潜在的危害，保护要求要更高。

多数的指导方针是关于危害牵制措施的，有效的牵制措施是使用不同水平的生物安全橱柜，这种生物安全橱柜是一个带有空气循环和排气控制装置的封闭环境。

表 9-2　生物安全/牵制措施水平总结

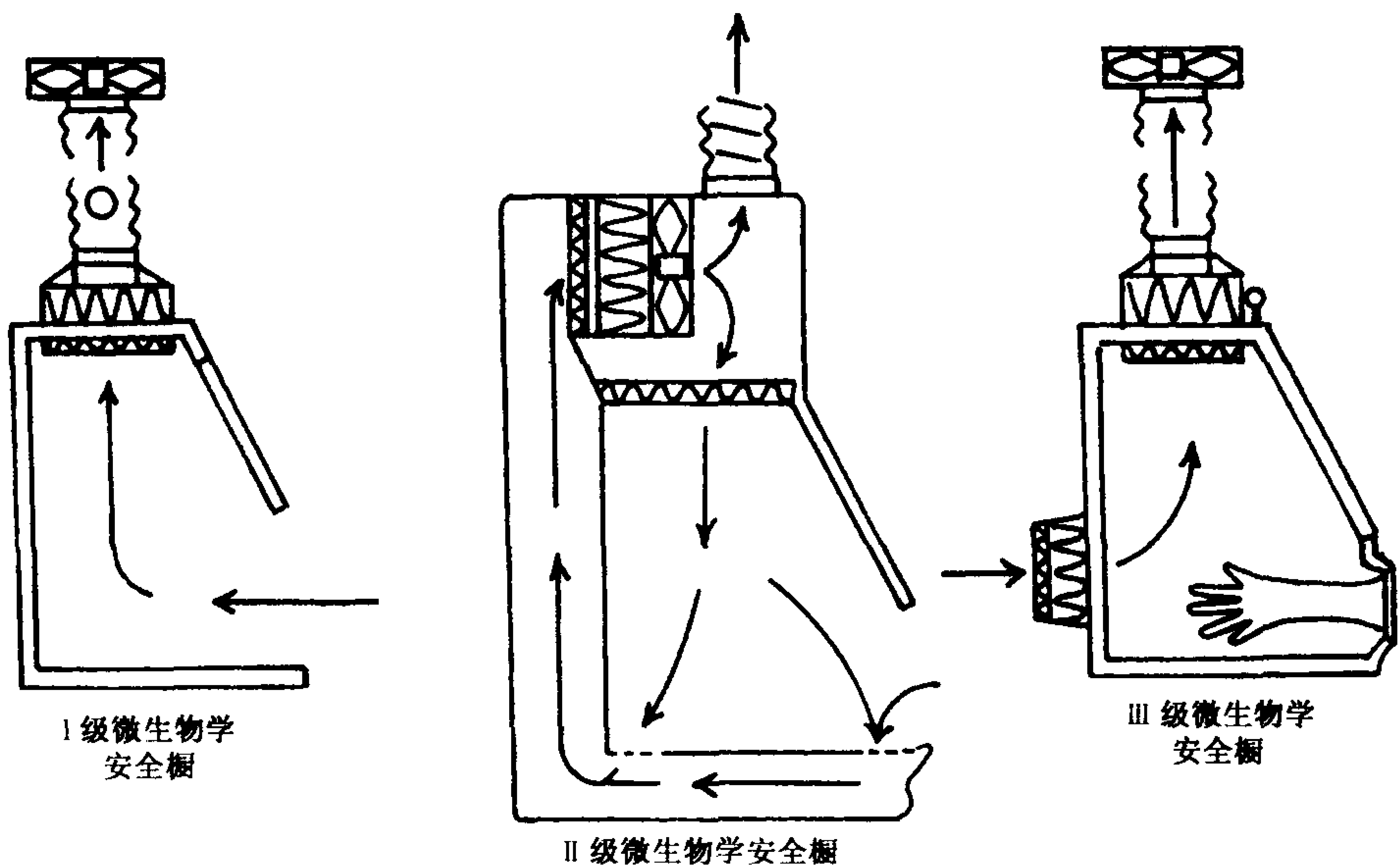
级别	要求	实验室要求	安全设备
1	基础	GMT[a]	无，在开放的空间中工作
2	基础	GMT 加防护服及生物危害的标识	开放的空间加上防止气溶胶的安全橱
3	牵制措施	2 级安全保护加特殊防护服及控制通行	所有操作都要在安全橱中进行
4	最大牵制措施	3 级安全保护加封闭环境、淋浴出口和废物的特殊处理	Ⅲ级安全橱，压力梯度和双末端高温灭菌

a GMT = good microbiological technique（好的微生物学技术）

生物安全橱

生物安全橱根据保护的数量分为三个级别，Ⅰ级、Ⅱ级和Ⅲ级（见表 9-3）。

表 9-3　生物安全橱



级别	实验员的保护？	实验物质的保护？	适用于
Ⅰ	部分保护 循环空气屏障，带HEPA过滤器的排气	没有 没有无菌的工作表面，房间内未过滤空气可进入工作区	低致癌的病毒 超声处理等日常实验，以及操作化学致癌物、低剂量放射性物质、易挥发物质等和通风橱类似，过滤效果较差
Ⅱ	部分保护 空气循环屏障，带HEPA过滤器的排气	有 所有流入的空气都经过过滤	低、中致癌的病毒 CDC 1～3级的试剂，所有需要BL2级保护的物质。细胞和细菌培养物
Ⅲ	全部保护 空间屏障（手套），带HEPA过滤器的排气	有 所有流入的空气都经过过滤 空气循环不如Ⅱ类，对原料的保护也不如Ⅱ类	CDC 4级的试剂、所有需要BL4级保护的物质。高毒性的化学物质和致癌物（排水管要特别处理）

Ⅱ级生物安全橱的无菌技术

> 感染的人血和病原微生物需要 *BL*3（有时要 *BL*4）级的安全橱，它可以提供一个负压的环境，大多数实验室没有这样的设备。

多数实验室研究人员处理的生物危害物质的**最高水平**是2级，所以垂直流动的Ⅱ级生物安全橱就足够了。

生物安全通风橱是层流通风橱或Ⅱ级垂直流动橱，提供工作区域内过滤和循环的空气，循环流动的空气形成了一个气帘，阻止外面空气进入工作区域，这样可以保护实验人员不会接触到实验中的生物危害物质。排出

的空气通过一个高效颗粒空气过滤器（HEPA），确保气体中的生物有害物质不会进入到房间内。

生物安全1级牵制措施对微生物的危害分类水平不如生物安全橱的分类严格。

然而，多数的通风橱都是用来保护实验而不是保护实验员的。它们最常用的是常规组织培养中避免细胞实验操作中的污染等。因为这种层流通风橱的设计是可以最大限度的减少空气中悬浮的微粒数量，所以橱内的试剂瓶就不易被污染，实验人员在这类通风橱内进行无菌操作时可以稍微轻松一些。

在操作放射性标记的Ⅰ时，通常是无菌操作，一定不能在Ⅱ级生物安全橱内操作，因为碘是挥发性的，必须在有TEDA活性炭过滤器的通风橱内操作，在实验前，必须考虑操作^{125}Ⅰ的实验需要。

在通风橱内学习无菌操作技术的人要比在开放的实验台空间里学习的人更容易大意，他们会认为通风橱能够帮助他们解决一切问题，这是不正确的。应该同样小心污染问题，在通风橱中实验产生污染的最大可能是手进出通风橱的时候会破坏风帘和空气的循环。

☆ **在生物防护橱中进行无菌操作**

尽管现在的生物安全橱内已不再安装紫外灯了（因为现在已经确认紫外灯对于减少污染没有什么用处，而且会给人错误的安全感觉），但是老式的通风橱还有，而且实验室还在继续使用，所以在使用安全橱前要确认紫外灯已经关闭。

1. **确认通风橱已经打开并且空气正在循环（开/关打开、声音、试验等）**。通风橱应该是24小时保持打开的，有时由于噪音和其他的原因通风柜可能被关掉，所以在实验前5分钟打开通风橱，让空气循环起来。
2. **把框格降低到刻度处**。如果没有标记，或者放到100±10ft/min的位置或12～14英寸处。框格一定要低于下巴，如果会产生气溶胶，则把框格放得尽量低。
3. **不要阻碍空气流通**。不要隔开锥形金属头和工作区间，例如用散落的纸张。
   - 不要堵住后部的通风口，在通风口的网格上放置物体时应尽量向后或两边，至少空出2英寸的位置。
   - 不要用物品把橱窗前面遮住。
   - 工作时要距台边至少6英寸以内。
   - 不要把身体靠在通风橱上。
4. **小心不要把碎纸和其他轻小的物体吸入排气管道内**。不要用单页纸记录实验数据，要用实验记录本。
5. **每次实验前用70%的乙醇或异丙醇等其他消毒剂擦拭桌面。**
6. **实验中如果必须拿下盖子，把盖子倒放在干净的表面上。**
7. **尽量减少手臂在通风橱内晃来晃去**。手臂的运动会影响空气的流动，在实验前把可能用到的试剂、仪器及废液杯等全部拿到橱内。
8. **生物安全橱内不要使用火焰灯**。它们会影响橱内空气的流动方式。

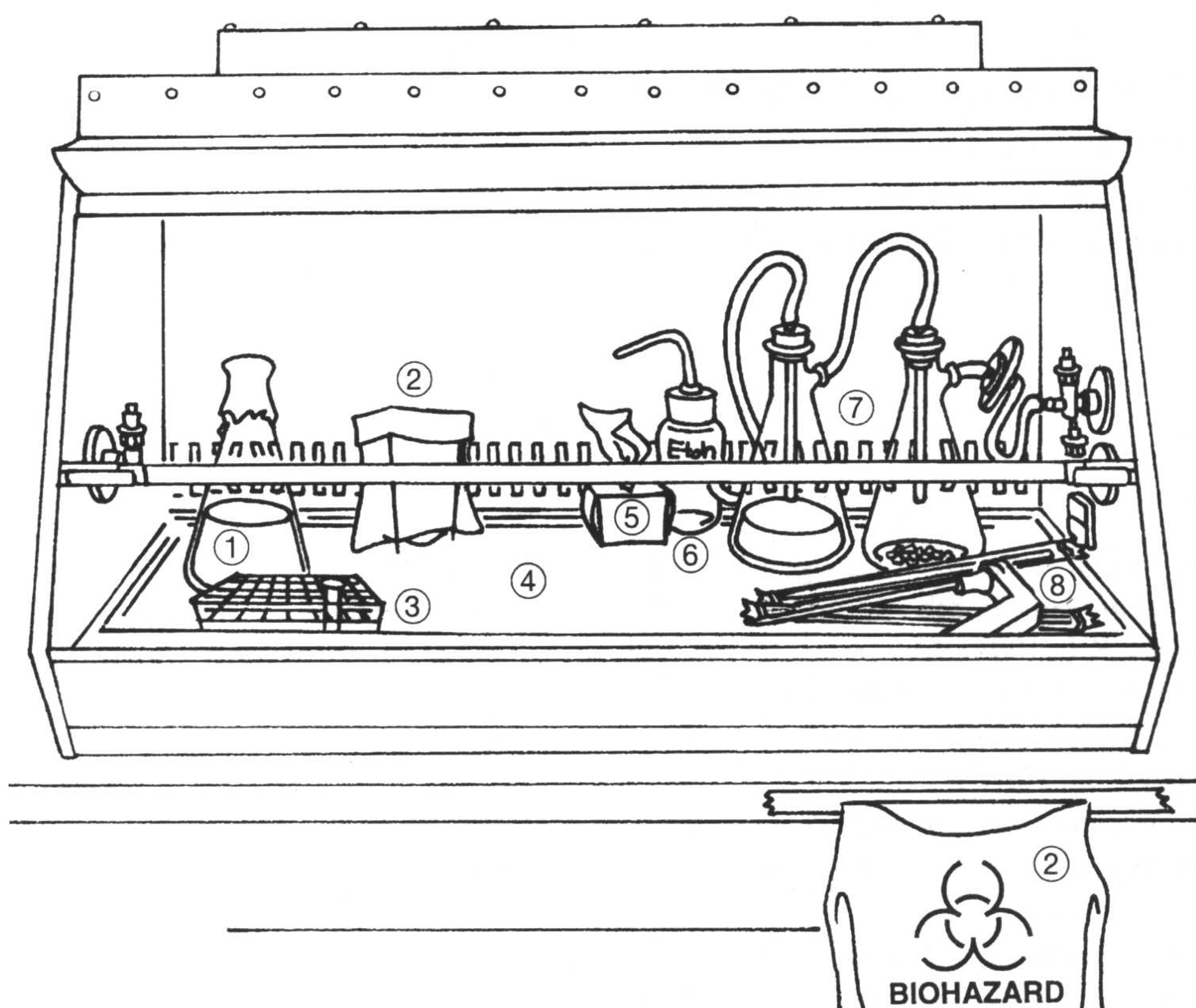


图 9-6　无菌操作的生物安全橱的布置

任务：从管中转移 5 ml 细胞培养物到 40 ml 培养基中。设备的安排是按右手实验者的习惯进行的，因此右手使用的物品放在右手边，左手的放在左手边。①装培养基的三角烧瓶；②丢弃生物危害废品的箱柜；③试管架和装有细胞的试管；④洁净区；⑤抽纸；⑥装 70％乙醇的洗瓶；⑦带滤器的抽气瓶；⑧移液辅助器和单独包装的移液管。

保持通风橱的功能

要养成实验前检查通风橱表盘读数的习惯，如果读数变化了，表明橱内的空气流动出现问题，这样会威胁橱内的洁净和防护。

橱格必须放置到标记的位置，当它被抬起时就会有警报响起，表明这样做会影响空气循环。所以要时常检查警报是否失灵，如果失灵，立即与环境健康与安全部门部门联系。

要定时检修生物安全橱以保证它的安全性和空气流动畅通，将上次和下次检修的日期贴在橱上。保证按时联系环境健康与安全部门部门对通风橱进行检查，经常更换 HEPA 过滤器（用来吸附橱内空气中的微粒），经常用甲醛等环境健康与安全部门部门推荐的制剂清洁通风橱，这种清洁至少需要一天的时间，所以要安排轮流清洁橱柜。

☆ **有礼貌地使用生物安全橱。**实验室不可能为每位需要使用通风橱的人配备一个，所以为了保证每个使用通风橱人员的安全，在使用橱柜时都必须遵守一定的礼貌规则。

- 遵守橱上张贴的注意事项和提醒。
- 尽可能快的使用通风橱。
- 自觉补充那些快用完的公用试剂，如 70% 乙醇等。
- 及时清理实验垃圾，不要让它们从垃圾箱中溢出来。
- 用完通风橱后清理内部。

（郝肇菁　王维荣　黄伟达）

参考文献

Collins C.H., Lyne P.M., Grange J.M, and Falkingham J. 2004. *Collin's and Lyne's microbiological methods,* 8th edition. Hodder Arnold, London, England.

Freshney R.I. 1994. *Culture of animal cells. A manual of basic technique,* 3rd edition, pp. 51–59. Wiley-Liss, New York.

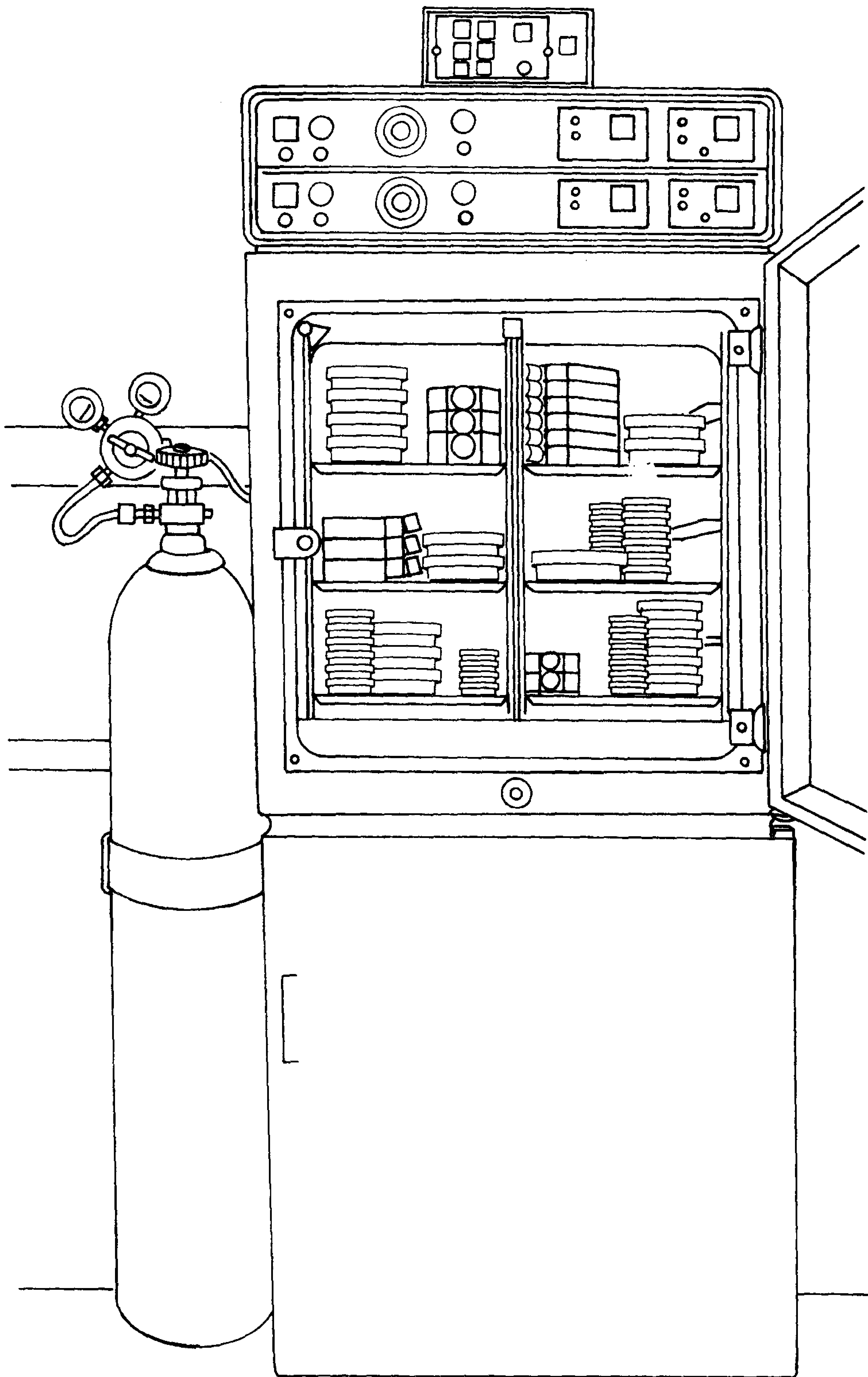
——. 2000. *Culture of animal cells: A multimedia guide.* Wiley-Liss, New York.

Gershey E.L., Party E., and Wilkerson A. 1991. *Laboratory safety in practice: A comprehensive compliance program and safety manual.* Van Nostrand Reinhold, New York.

Heidcamp W.H. 1995. *Cell biology laboratory manual.* Gustavus Adolphus College, St. Peter, Minnesota.
http://homepages.gac.edu/~cellab/index-1.html

McCarty M. 1985. *The transforming principle. Discovering that genes are made of DNA.* W.W. Norton & Company, New York.

Richmond, J.Y. and McKinney, R.W., eds. 1999. *Biosafety in microbiological and biomedical laboratories,* 4th edition. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Protection, and the National Institutes of Health. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmbl4/bmbl4toc.htm



第 10 章　真核细胞的培养

认识你的细胞。在进行一系列实验前实验室的同事给你一管或一瓶细胞，并简要介绍一些培养这种细胞的注意事项。其实远远没有那么简单，有些细胞可能很好培养，但随着你对细胞越来越熟悉，就会越来越多地掌握它的特性，在遇到问题时也更容易解决和解释。仔细阅读细胞的说明书，并且向那些培养过的人请教心得，最重要的是要不断观察细胞的生长情况，直到你完全掌握了它的特性。

培养类型和细胞株

细胞培养可以用两种方式描述：

- 细胞的来源
- 生长方式

根据来源分类

☆ 原代细胞分离于动物或植物的组织经，培养获得。

细胞一旦分裂就成为有限传代细胞株，并且有可能变成无性增殖化细胞。

把正常细胞来源的有限传代细胞株持续传代，筛选出快速生长的细胞，就有可能把有限传代细胞株转变成持续传代的细胞株，这个操作就是自然转化。

表 10-1　根据来源进行细胞培养分类的种类

	来　源	与组织相溶性	维护	加　倍
原代细胞	动物组织、胚胎或成体	典型	难	0～1
有限传代细胞株	动物组织，通常是胚胎	典型	难	胚胎：20～80、成体：有限的
连续传代细胞系	原始细胞和有限传代细胞株的自然转化	不是特别典型；细胞分化减少	易	不确定、通过筛选高生长率的细胞获得
转化的细胞株	癌组织，持续传代的细胞株在体外的自然转化，整个病毒或病毒 DNA 的在体外的转化	不是特别典型；细胞比亲代分化减少	易	不确定，通过筛选高生长率的细胞获得
杂交株	融合分泌抗体的 B 细胞和恶性骨髓瘤细胞	细胞类型不典型	难	有限的

原代细胞的来源将影响细胞的生长方式，如果细胞来源于成纤维细胞，就要附着培养，但是一旦细胞转化以后，它的生长方式就不再和原代细胞一样。

☆ **持续传代的细胞株有更高的生长速率、克隆效率、成瘤率和更多的染色体组型。**

细胞株分化度越高，它的生长也就越慢。

持续传代细胞株经常被改造成所需的独特表型。

常用的细胞株

细胞株	细胞类型和来源	贴壁或悬浮培养
3T3	成纤维细胞（鼠，胚胎）	贴壁培养
BHK21	成纤维细胞（叙利亚仓鼠，肾脏）	悬浮培养
MDCK	上皮细胞（狗，肾脏）	贴壁培养
ES	胚胎干细胞（人、鼠）	贴壁培养
HeLa	上皮细胞（人，腺癌）	贴壁培养或悬浮培养
PtK1	上皮细胞（袋鼠，肾脏）	贴壁培养
L6	成肌细胞（鼠，骨骼肌）	贴壁培养
PC12	嗜铬细胞（鼠，肾上腺嗜铬细胞瘤）神经细胞研究	贴壁培养
Sf9	（卵巢，黏虫）杆状病毒感染	悬浮培养
SP2	浆细胞（鼠，骨髓瘤）用于杂交瘤	悬浮培养
S2，S3	胚胎细胞（果蝇）（施耐德细胞）	贴壁培养

☆ **转化细胞是从常规的细胞转变为具有癌细胞特性的细胞。**

这些细胞株有些来源于肿瘤细胞，有些是在培养中由于突变导致的自然转化。细胞还可以通过化学药品诱导或可以诱导肿瘤的病毒转化得到，这种病毒通常可以错误或者过量表达与细胞生长相关的蛋白质因子。不管通过什么手段得到的转化细胞，都会导致细胞形态学、功能、生长的特征以及下列一些特征的改变：

- 细胞生长密度增加
- 生长因子和血清的需求量下降
- 更强的贴壁独立性
- 不确定的增生能力

贴壁培养的转化细胞通常为高度的贴壁非依赖性，甚至对组织培养器皿也是低贴壁。洗细胞要特别小心，松散的单层细胞会不经意地被冲走。

☆ **杂交瘤细胞可以分泌单克隆抗体到培养基中，通常浓度很高，细胞培养液的上清可以直接用来进行杂交实验。**

根据生长习性分类

根据细胞在液体或半固体培养基中的生长情况分类，生长特征只是功能上的描述，并与细胞来源有关。

悬浮和贴壁生长是细胞的特性和培养条件，有些细胞可以以两种方式进行。

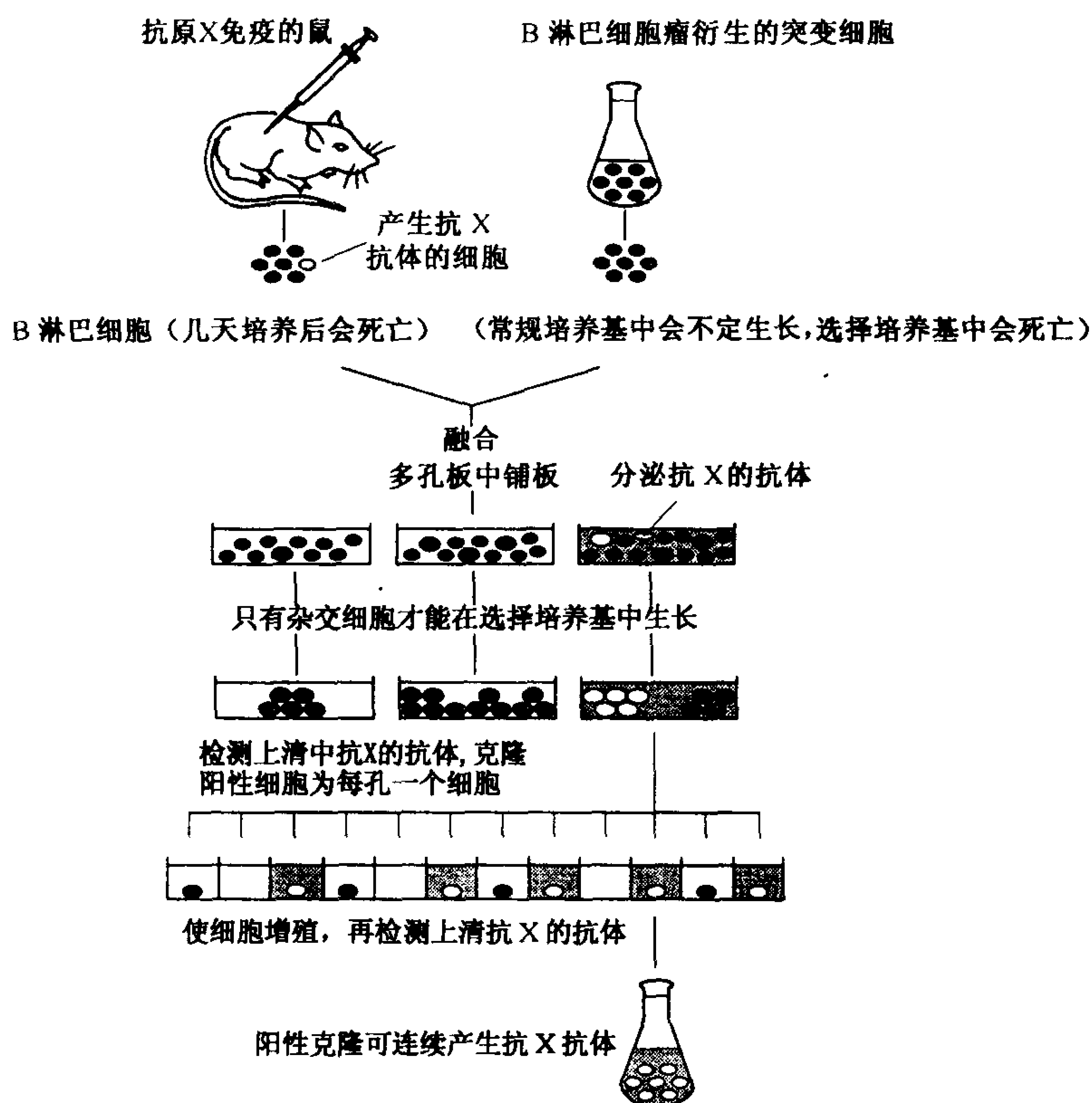


图 10-1　制备分泌抗特定抗原 X 的单克隆抗体的杂交瘤细胞

筛选培养基中加入了氨甲喋呤抑制剂，可以抑制核苷酸正常生物合成的药物，所以细胞必须采用其他途径合成核酸，而只有杂交瘤细胞株可以采取这种途径合成核苷酸，原始细胞都不能生长。

☆ **悬浮或贴壁生长**

最初的也是最实用的对细胞生长情况的描述就是细胞在液体培养基中的行为。细胞株及其来源细胞的行为构成了细胞株说明的主要内容。

- **悬浮细胞**在培养基中悬浮生长，可以在不接触任何表面的情况下生长繁殖。从血、脾或骨髓中得到的培养细胞，特别是未成熟的细胞，趋向于悬浮生长。悬浮生长的细胞呈球状，悬浮培养的好处是能够很容易得到大量的悬浮细胞，收集容易。
- **贴壁细胞**在培养皿表面黏附生长成一个单层，来源于外胚层或内胚层的细胞趋向于贴壁生长，还包括成纤维细胞和上皮细胞。贴壁生长的细胞呈多种形态，但通常都是扁平的，同样的细胞悬浮培养时则为球状。贴壁培养的好处是使细胞能够附着并且顺着容器表面生长，更容易进行显微观察、杂交和其他功能实验。

☆ **贴壁依赖和非贴壁依赖生长**

细胞生长分非贴壁依赖性生长和贴壁依赖性生长。尽管非贴壁依赖性生长是通过软琼脂（细胞包埋/悬浮在其中）来衡量的，但是在组织培养皿中还是会有一定的影响。非贴壁依赖性和贴壁依赖性生长是细胞的属性，不随培养条件而转变。

- **贴壁依赖性细胞**在繁殖时需要接触表面。

- **非贴壁依赖性细胞**在繁殖时不需要接触，这也是转化细胞的通常性质。在组织培养皿中非贴壁依赖性细胞只是松散地附着在表面。

观察细胞

将观察培养细胞成为你的习惯，无论何时用细胞进行实验，都应用肉眼或者显微镜观察细胞。如果细胞长得不好，你的实验也不会成功。

当从培养箱中拿出细胞培养瓶时，注意：

- 培养基的颜色，多数培养基中都有酸碱指示剂，如果培养基偏酸性则显现黄色，如果偏碱性则略呈紫色。如果培养基的 pH 值变化很大则说明培养基被污染、或细胞生长过密、或细胞死亡过多、或是培养箱中 CO_2 浓度调节出现了问题。
- 培养基变浑浊时说明培养基被污染或是细胞生长过密。
- 丛生的细胞（悬浮培养）和游离的细胞（贴壁培养）。

如果用锥形瓶或培养皿培养细胞，那么在超净台内操作细胞前最好先在倒置显微镜的 40 倍物镜下观察细胞的生长情况，而且尽量养成这种习惯。

☆ 贴壁细胞

正常情况下观察到的细胞应该是规则均匀分布在培养皿底面上的一层细胞。每种细胞都有其自身的形态特征：球形、三角形、方形、长形等等。细胞的生长方式有些像鹅卵石铺成的路面、有些呈漩涡状、有些是随机形态、而有些则覆盖了另一些细胞。

在单个细胞中能够发现一个比较暗的圆形细胞核，其内还有更暗的核仁。有时核仁大得把细胞质挤成很小的一块。分裂时期细胞核可能成半球状或成对出现，沙漏状（有丝分裂）细胞中浓缩的染色体有时也可以观察到。

☆ 悬浮细胞

悬浮培养的细胞呈球状，有些细胞也会轻轻地附着在培养皿的表面，在轻轻晃动培养皿时这些细胞不会移动，呈扁平状或是三角形。这些细胞上面就是球形的悬浮着的细胞，它们呈颗粒状，即使是在 100 倍显微镜下也不能观察到细胞核和其他的细胞器。

大多数的倒置显微镜最大只有 40 倍物镜，如果想在更大倍数下观察细胞（如检查是否被细菌污染），可以采用固定染色或是制成湿制标本，在倒置复合显微镜的 100 倍油镜下观察。(详见第 16 章)。

> 必须熟悉培养的细胞的正常形态，每当拿到一个新的细胞株时，要尽可能多的观察并熟悉细胞的正常生长情况，而且要与熟手经常讨论培养细胞中遇到的问题。

获得细胞

> 在实验室中如果要接触人的原始细胞，特别是血细胞，最好先注射乙肝疫苗，即使不是由你亲自分离细胞，溢出物或是气溶胶还是会有传染的可能。

原代细胞

原代细胞是很难分离得到的，这种细胞通常要杀死动物并解剖获取组织，再分离和培养细胞，这些操作是非常耗时，也容易出错。多数细胞类型都只能得到一点点，而且原代细胞的生存时间很短。然而原代细胞是最接近实物的，如果你确实需要它们（经反复考虑），所有的努力都是值得的。

不要幻想能从别人那里要到这种原代细胞，因为一个实验室所分离得到的细胞可能还不够他们自己使用，要考虑获得原代细胞的难度，所以要不到也不要气愤。

- **请教实验室或系里**做过这种细胞的人。对于第一次实验，向他请教所有方面的问题，并且争取要到可供预实验的细胞。
- **请教**培养过这种细胞的**另一个研究者**。除非你与这个人的关系特别好，否则会很难。如果细胞对实验是必须的且极难获得，你只能与细胞的拥有者进行正式合作。与实验室的负责人协商，因为这种类型的合作通常会涉及尖锐的甚至政治性问题。

一封索求信要包括

电子邮件联系，说明要求

你和你实验室的情况（简短）

你的项目（简短）

通过什么方式得知细胞拥有人的情况（简短）

细胞用于什么实验（简短，但要诚实）

留下你的地址和电话

末尾要表示万分感谢

索求信也可以提出合作的要求

如果几个星期后没有收到回信，就再写一封电子邮件或直接打电话，通常索要细胞都是比较难的，所以一定不要灰心也不要着急。

- 即使有人能给你细胞，**至少要看一遍实际操作过程。**事情是变化的，你可能在某个匆忙的一天不得不自己进行操作。要尽可能多地了解细胞的情况，对提供者表示出感激和对操作表现出强烈兴趣。

合作者有责任提供所用的细胞，但是他也将成为课题中的一员，所以根据这个细胞的实验结果而撰写的文章也要包含他的名字。

- **医院或医学院**是很好的人体组织和细胞的来源地，但是必需要找到联络手段，许多**血库**出售部分分离出的血细胞。
- 多数情况**你要自己分离细胞。**不要拿到操作程序就动手，可能的话，尽量先找做过的人示范。
- 有些**公司**也出售原代细胞，价格十分昂贵。如果使用的是一种特别难分离得到的细胞，购买用于一次实验的量是值得的。通过系、所的专门购买机构和这些公司联系，最好能够问到有哪些人使用过这种细胞，并且和他们联系，他们会

在得到任何人类材料前要获得单位 IRB 的同意，也要与实验室安全部门协调，处理海外运来的所有细胞的事宜。

很高兴与你一起讨论。

持续传代的细胞株

如果细胞株生长得很好，就很容易得到细胞，如果生长不好，就会和得到原代细胞一样困难。

- 要紧记任何一株细胞在进行持续培养时都会有**表型漂变**。两个实验室培养同一株细胞时，可能会有不同的表型特征出现，所以要向做同一种实验的实验室索求细胞。
- 如果实验室中还有其他的人在使用同样的细胞，找他要一个冻存管用于传代。由于传代的次数比较少，可能会得到典型的细胞。如果你要到的是传代细胞来应付眼前的实验，那么你可能永远得不到最初的类型，而得到的只是这个细胞的子代。
- 最常用和最可靠的细胞株来源之一就是 ATCC (american type culture collection)，这是一家私营非盈利性的组织，它收集、保存和销售各种动物和人类的细胞株，另外它还提供一些微生物、病毒、DNA 探针和植物。他们提供的商品保证能成活和无污染，如果在培养中出现了问题，他们负责调换。目录中不仅包括了细胞清单和种类，还包括有相应的参考文献、培养基配方、标注和其他一些有用的信息和提示。
- 还有一些组织免费或收取少量费用提供有限种类的细胞株。还有些科研工作者拥有 NIH 颁发的许可证明，可以保存和提供给别人某些特殊种类的细胞株用于实验研究。
- 在和实验有关的文献中，找出你认为最好的文章，在其材料和方法部分查到细胞来源，记下一切有用的信息，如传代数和培养基配方等等，为重复实验做好准备。如果你感兴趣的细胞株正好是作者分离的，尝试与其联络，索求细胞。

在观看提供者按照步骤操作时，应记下所有不清楚和自己独立操作可能会忘记的事项。分离细胞的实验有许多细微的注意事项，比如，试管振荡时间，使用什么离心机以及培养基要铺多高等等，所以要记下尽可能多的细节。

把细胞当作有传染性的试剂来看待，它可能带有病毒等生物，仔细阅读有关防护措施，不要用嘴来操作移液管，戴好手套，要十分小心地操作。

要把所有看到的文献和报告中提到的细胞来源记清。

如果作者是从 ATCC 和其他的公司得到的细胞株，那么就不要和他联系索求了，直接联系 ATCC。惟一的例外是你十分缺钱的情况，或是作者在 ATCC 提供的细胞株基础上重新构建的亚型。

复苏细胞

背景

真核细胞通常悬浮在带有血清和冷冻剂的培养基内，保存在 −196℃ 的液氮中。如果是商业订购的，通常储存在用干冰包裹的冻存管或安瓿瓶中。所以冻存后的细胞必须快速解冻后立即培养，以获得最大的生存能力，

如果去别的实验室取细胞，在保温瓶或其他保温容器内装上干冰来携带细胞。

为了除去冻存时的添加剂，24 小时后要更换培养基。

> 融解的细胞必须马上培养，如果来不及培养，就保存在液氮中。

> 细胞通常冻存为 1 ml 的体积，加入新的培养基至 10 ml。

材料

- 培养基，37℃预热
- 培养瓶
- 装有 70% 乙醇的烧杯
- 1ml、10ml 的移液管、移液器及移液头

步骤

1. 把冻存细胞的管子在 37℃的水浴融化，快速摇动，1 分钟内使管内的细胞融化。
2. 把融化的管子浸入装有 70% 乙醇的烧杯内，整个实验在超净台内进行。
3. 小心打开安瓿瓶或冻存管，不要让乙醇浸入管内。
4. 将安瓿瓶或冻存管内的细胞转移到培养瓶中，并立即加入预热的培养基。
5. 盖好培养瓶的盖子，培养 24 小时。
6. 用新培养基替换老培养基。
7. 继续培养 2～3 天或按说明书上的建议进行操作。

> 可以在融化了冻存细胞后，把细胞离心下来，并用新鲜的培养基重新悬浮细胞，这种做法只适用于那些对冻存剂敏感的细胞，或者是第二天因为有事不能更换新培养基的情况。

> 安瓿瓶是玻璃制的，在有压力的情况下有爆炸的危险。将安瓿瓶从液氮里拿出来时，最好戴上眼罩和面具，拿出来后立即放入超净台内操作。无论什么时候操作液氮中的细胞，你最好戴上眼罩和面具。

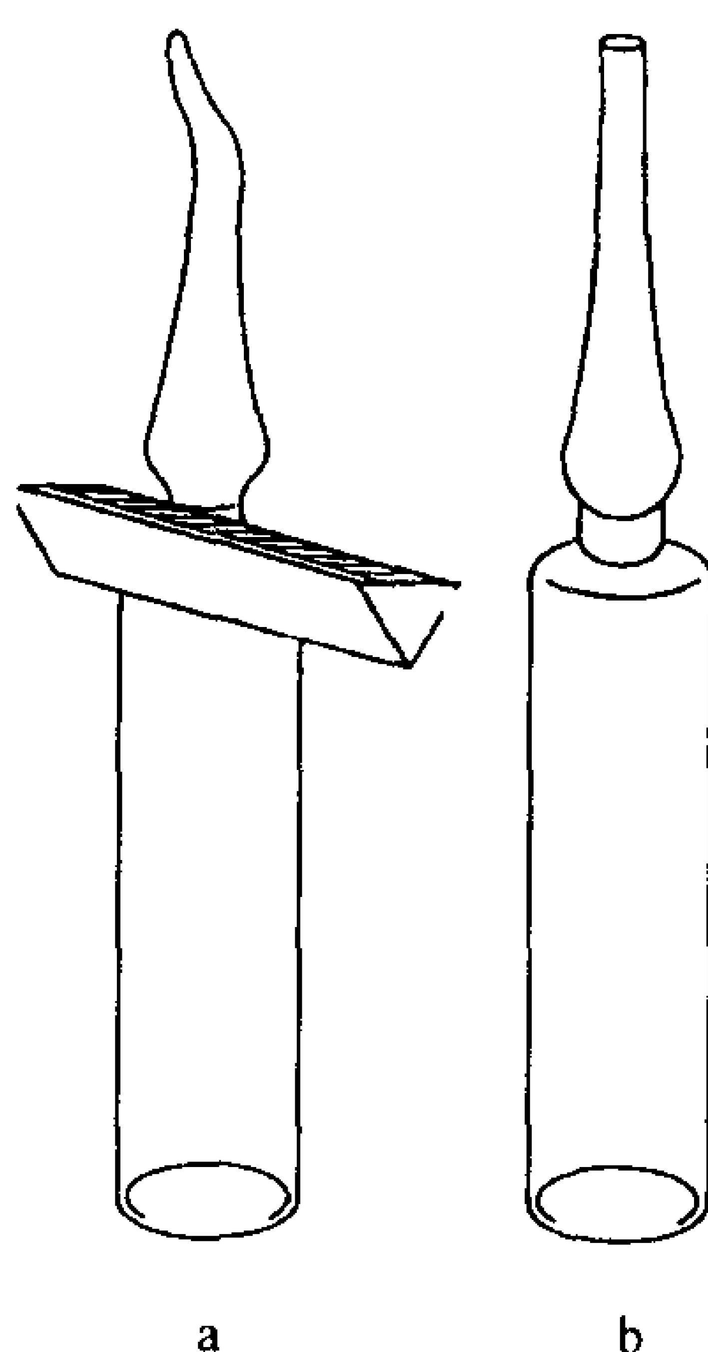


图 10-2　安瓿瓶的类型

a. 标准安瓿瓶，必须用玻璃刀或者砂轮在瓶颈处打磨一圈，再用纱布或是纸巾包裹住，左手拿住瓶底部，右手把瓶子的头部掰下来。b. 特制安瓿瓶，在瓶颈处有一环带，可以包好后直接把头部掰下来。

细胞的维护

细胞株的日常保养

☆ **为了维护细胞，必须：**

- **给养**（给予新鲜的培养基），细胞生长过程中会消耗培养基中的某些必需因子，必须更换培养基。
- **分瓶**（传代、细胞数量减少），随着细胞的生长，细胞数量会不断增长而超出容器和培养基的负荷。

培养和传代是同时进行的，很难只进行一个而不进行另一个操作。

- **冻存**，不论什么时候你得到一个或生成了一个细胞株，都必须分装冻存样品。这些冻存的样品可以作为备用，防止细胞表型的漂变或是污染。

规则：观察你的细胞！ 永远不要在没有进行倒置显微镜观察的情况下就进行细胞传代、细胞实验或冻存细胞。通过连续的观察，你不仅能够在污染没有成为主要危害前发现它，还能在细胞形态发生变化时知道漂变的产生，还能决定什么时候传代、什么时候进行实验以及什么时候放弃实验。

给养和传代

细胞生长得越快，给养和传代的频率也就越高，当你拿到一株细胞时，找出：

- 有没有使用抗生素？
- 细胞是如何生长的？
- 最好使用什么培养基？
- 细胞生长是否需要血清？
- 细胞分瓶和给养的频率是多少？

滋养层细胞。克隆细胞以低密度生长或需要复杂营养的细胞（如胚胎干细胞）可能需要滋养层细胞，滋养层细胞是经γ辐射钝化了的普通细胞，但能提供给细胞以代谢物和基本滋养需要，它们可以通过市场获得，也可以实验室自制。

抗生素

大多数实验室都使用抗生素，但是如果无菌操作技术掌握得好，抗生素也不是必需的。多数抗生素在37℃时的半衰期都很短（见表10-2），培养基内实际的抗生素浓度要比以为的低。

表 10-2　细胞培养基中常用的抗生素

抗生素	作用对象	工作浓度	贮备液浓度	半衰期（37℃）	结构分类	机　制
苄青霉素（青霉素G）	革兰氏阳性菌	100单位/ml（约100 μg/ml）	10 000单位/ml	2天	青霉素	抑制细胞壁的合成
链霉素	革兰氏阴性菌	100 μg/ml	10 mg/ml	4天	氨基糖甙	抑制翻译（30S亚基）

续表

抗生素	作用对象	工作浓度	贮备液浓度	半衰期（37℃）	结构分类	机　制
卡那霉素	革兰氏阴性菌	100 μg/ml	10 mg/ml		氨基糖甙	抑制翻译（30S 亚基）
四环素	广谱细菌	10～50 μg/ml	5 mg/ml	15 天	氨基糖甙	抑制翻译（30S 亚基）
庆大霉素	广谱细菌、支原体	50 μg/ml	5 mg/ml		氨基糖甙	抑制翻译（30S 亚基）
林可霉素	支原体、革兰氏阳性菌	50 μg/ml	5 mg/ml			抑制翻译（50S 亚基）
泰乐菌素	支原体、革兰氏阳性菌	10 μg/ml	5 mg/ml		大环内酯物	抑制翻译（50S 亚基）
两性霉素 B	真菌、酵母	2.5 μg/ml	250 μg/ml	4 天	多烯类	改变细胞膜的通透性
制霉菌素	真菌、酵母	20 单位/ml	2000 单位/ml		多烯类	改变细胞膜的通透性

由于一些比较贵重的细胞经常要被操作，所以很容易污染，而如果培养基中没有添加抗生素就会使实验员感到十分棘手。

细胞培养所用的抗生素通常以干粉形式保存，使用前用无菌水或其他溶剂将其溶解，这样得到的抗生素溶液不需要再进行过滤除菌。

常规使用中，不建议使用抗真菌试剂——两性霉素 B 和制霉菌素，它们会影响真核细胞的半透性。

细胞培养的两种标准抗生素

庆大霉素，储存液浓度 5～10 mg/ml，工作浓度为 50 μg/ml。

青霉素（10 000 单位）/**链霉素**（10 mg/ml）的储存液，工作浓度为 100 单位/ml 和 100 μg/ml。把它们分装成 1 ml 保存在 -20℃，工作浓度为每 99 ml 培养基加入 1 ml 的抗生素贮备液，如果培养基用量较大，则把抗生素分装为 5 ml，使用时每 500 ml 培养基中加入 5 ml 抗生素。

培养瓶

选择培养瓶类型根据培养细胞的种类和体积来决定，大多数实验室使用锥形瓶和培养皿来培养悬浮生长或是黏附生长的细胞，也有一些其他类型的容器用来培养大量细胞或是特殊种类的细胞。

大多数组织培养容器是一次性聚乙烯材料的，并且通过放射线灭菌，玻璃容器很少使用，使用起来不如一次性器皿方便。

非处理过的塑料器皿常常用来培养悬浮生长的细胞，而多数贴壁生长的细胞在处理过的器皿表面生长较好。实验耗材公司所提供的经“处理”过的组织培养器具，因处理的方式不一样（把聚乙烯材料的表面进行永久性的修饰，如增加离子体和氨基官能团等），细胞生长可能偏爱某个公司的产品，因此不要轻易更换耗材提供商。

细胞培养用的器皿可以用一些非特异性的蛋白质修饰，这种蛋白质可能带正电，如

多聚D型赖氨酸。

有些细胞必须附着在某些特殊的基底上才能分化，或是表现出某种特殊的功能，所以在细胞外基质中可以添加一些特殊的物质，如胶原蛋白、纤维结合素和层黏连蛋白等。

实验室也可以进行一些器具的表面处理，如向容器中注入含有某些悬浮物质的溶

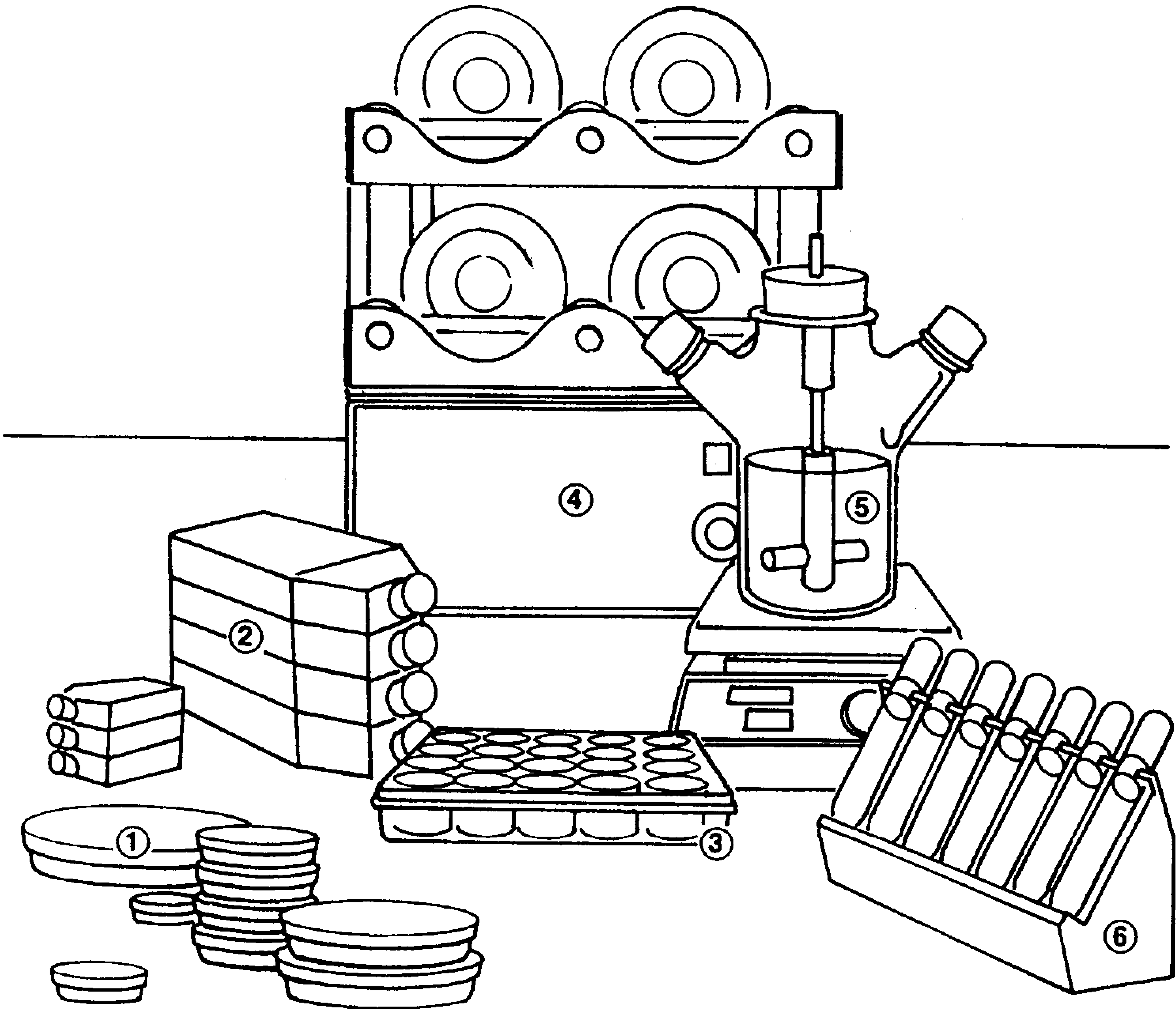


图 10-3　细胞培养用的容器

①培养皿，通常用来培养贴壁生长的细胞，100 mm 规格的可以盛 10 ml 的培养基，多数经过处理以最大限度地贴壁细胞，不要与细菌培养使用的平板弄混，细菌培养的培养皿是不经处理的。60 mm 规格的可以盛 4～5ml 而 35 mm 的可以装 1～2 ml 培养基。②培养瓶，有直颈和曲颈两种，直颈可以减少液体的溅起，对培养悬浮生长的细胞有益，而曲颈瓶可以很容易地接触到培养基的表面，对操作贴壁生长的细胞有益。事实上两种瓶子都可以用来培养贴壁和悬浮生长的细胞。常见尺寸有 25 cm^2（50 ml）、75 cm^2（250 ml）、175 cm^2（750 ml）。③多孔的细胞培养板，这种培养板的标准大小为 86 mm×128 mm，分为 6、12、24、48、96 孔板，并有配套的自动稀释器和平板读数器，适用于进行细胞杂交、单克隆抗体实验、滴定和毒性检测实验等，以及需要进行不同条件下对比观察的实验。这样的平板通常是已经事先处理过的，既可以用来培养悬浮生长的细胞，又可以用来培养贴壁生长的细胞。平板有平底和圆底之分，大多数情况下使用平底平板。④滚动瓶，用来扩大培养，既可以用来培养悬浮生长的细胞，又可以用来培养贴壁生长的细胞，可以用在开放或是封闭的系统内。⑤带旋转器的培养瓶，它可以缓慢地旋转，使细胞不会被搅拌器影响，用来培养悬浮生长、微型载体细胞及昆虫细胞，还可以加入不同的混合气体，用于开放或是封闭的系统。⑥试管，用于培养贴壁生长的细胞，由于是圆底的，所以细胞可以在试管内壁任意区域生长。Leighton 管有一面是平的，可以用来进行显微观察。

液，并通过保温使其附着在容器表面，弃掉过量溶液后用缓冲液或培养基清洗容器的表面。

细胞培养基

多数实验室购买的培养基或者是预先处理好的瓶装液体培养基，或者是干粉状的需要水化和过滤除菌的培养基，后者比较便宜，用量大时则更有价值。

> 市售的培养基是有保存期的，可能会黏附不好，但可以用来清洗细胞。

由于培养基中都有酚红或其他染料 pH 指示剂，虽然外观看上去都差不多，但事实上它们并不一样，所以千万不能用错。查找所需的培养基，向那些保证培养基不被支原体污染的供应商定购。

> **添加有酚红 pH 指示剂的培养基的颜色**
>
> pH6.5 以下为柠檬黄
> pH6.5 为黄色
> pH7.0 为橙色
> pH7.4 为红色
> pH7.6 为粉红
> pH7.8 为紫色
>
> 大多数细胞的最适 pH 为 7.4 左右。
>
> 微黄色的培养基为酸性，说明：
> 细胞过量生长
> 细菌污染
> 培养箱中 CO_2 浓度过高
>
> 紫色的培养基为碱性，说明：
> 细胞生长极为缓慢，甚至没长
> 霉菌污染
> 培养箱中 CO_2 的浓度过低

有些细胞需要在培养基中配制时添加其他成分，L-谷氨酰胺是最常见的补充剂，会很快被用尽。这些添加物可以现配后过滤除菌再加入培养基内，也可溶解后使用那些分装好的储存溶液。

> 直接接触细胞的一切试剂都要小心，特别是溶解在 DMSO、乙醇和甲醇内的成分，因为这些溶剂在高浓度时对细胞都有毒性，所以在加入时要不断地晃动培养容器，使得加入的试剂马上被稀释，不会产生局部的高浓度。

细胞培养基中有许多热不稳定的成分，必须低温保存，但是培养基在接触细胞以前必须要事先预热到 37℃，千万不要把冷的培养基加入细胞内。由于培养基中的许多成分对热不稳定，比如一些抗生素在 37℃ 时的半衰期很短，所以千万不能把培养基一直放在 37℃，

最好只在使用培养基的 10 分钟前再预热，用多少培养基，就取出多少预热。

最好买 500 ml 瓶装的培养基或在 500 ml 的瓶内配制培养基。如果你一周使用 500 ml 培养基，使用前一次加入血清和其他不稳定的试剂。但要注意先吸出适量的培养基，使得在加入其他成分后最终的体积还是 500 ml。

即使是生长极为缓慢的细胞，也要经常更换培养基，因为细胞可能会用尽培养基中的某种成分。

如果要加入 10%的血清和 5 ml 抗生素，那么用试剂瓶配好 445 ml 的培养基后再加入血清和分装好的抗生素。

血清

血清可以提供细胞生长所必需的生长因子和营养元素，某些细胞特别是转化后的细胞，对于血清的需要量是很低的，在 0.5%左右。有些细胞被“培养成”只生存在低血清浓度的培养基中。由于细胞生长所需的物质已经被完全定性，所以更多的细胞是被培养在添加有特定物质的基础培养基中。如果细胞能够生存在不添加血清的培养基中则是一种比较幸运的情况。

使用血清的时候有一些参数要注意：

- 血清的浓度。大多数细胞的适宜浓度为 5%～20%。
- 血清的种类。有些细胞偏爱马的血清，组织细胞培养的标准血清为小牛血清，而有些细胞则需要更贵的胎牛血清，还有些细胞（特别是人的）则需要最贵的同种生物血清。
- 血清是否为热灭活血清。血清的某些成分遇热失活，比如补体。
- 能从哪里得到血清。由于特定的细胞只能使用特定的血清，使用之前要先向实验室的人员或正在培养细胞的人员询问。虽然不同的公司价格不同，但是血清的选择标准不应该是省钱。

血清是十分昂贵的，常常是分装后冻存的，只是在使用前再加到培养基中。把融解后没有用完的血清继续冻存在冰箱里，血清在冰箱里可以保存几个星期。

热灭活血清

把冻存的血清在室温条件下融化，如果是 500 ml 体积可能要 5～6h。融化后的血清在 65℃保温 30 min 后分装。分装时要根据血清的浓度和培养基所需要的量，分装后要冻存，使用时再把冻存的溶液放入 37℃水浴中融解。

怎样分瓶细胞

每种细胞都有各自的生长速率，分瓶的时机也各不相同。而细胞的密度情况又会影响到细胞自身的生理情况，所以必须耐心地将细胞维持在最合适的密度，而且每次实验时细胞的密度也要尽量保持一致。

通过血清可能传播的感染因子或颗粒，因此政府或公司关心血清的来源。确认质量控制情况，只购买能够确定血清来源公司的血清。

细胞培养过程中要不断进行细胞分瓶以使细胞维持在合适的密度。理论上，每次分瓶时都要对细胞进行计数，实际操作中细胞分瓶只是根据特定的新旧培养基的比例来进行混合，新旧培养基的比例为4:1，也就是每10 ml细胞液加40 ml的新培养基。这样的操作虽然有点偷懒，但是对许多细胞都是可行的。如果按这种方法进行分瓶，也要在分瓶前后进行计数，了解细胞的数目，记录分瓶的比率。

> 血清有许多种类，多数实验室都尝试了多种血清，为找到最适合细胞生长的血清，并大量购买。由于血清存在着公司间的差异，所以要经常检验所用的血清是不是最适用于你的细胞。

通常每个星期分瓶两次，大多数的细胞株大约24小时后数量就会加倍，所以几天后就达到分瓶前的密度了。分瓶时可以适当地降低细胞的数量，但是不能太稀，细胞数量太少会导致细胞停止生长，这样可以每星期分瓶一次。但是要注意细胞密度过大时细胞也会停止生长，甚至变得不正常。

细胞培养中的常见错误

- 没有适时分瓶，使得细胞生长密度过高。
- 实验用的细胞密度明显不正确，但是又没分瓶或再培养一天就进行实验。
- 使用旧的培养基而没有配制新的。

分瓶时，贴壁生长成单层的细胞必须从培养瓶上洗到悬浮液中，但这些细胞常常分泌出一些胞外基质，使细胞与基底间紧密结合在一起，而且细胞间也通过依赖Ca^{2+}的受体-配体系统黏在一起使得洗下细胞变得困难。当然可以把细胞刮下来，但会破坏细胞，所以通常都使用胰蛋白酶消化细胞。对于附着力很强的细胞，则先用EDTA螯合Ca^{2+}，再用各种不同的蛋白酶消化使细胞脱落。

> 细胞操作时动作一定要轻。

表10-3　计数或转移时剥离细胞的方法，过程由温和到剧烈

方法	适用细胞
1. 震落	有丝分裂时或附着力较低的细胞
2. PBS中的胰蛋白酶[a]（浓度0.01%～0.5%，通常使用0.25%，消化5～15min）	多数持续传代的细胞
3. 先用PBS或CMF洗细胞，再用溶解在PBS或柠檬酸盐溶液中的胰蛋白酶消化	一些附着力强的早期持续传代细胞系
4. 先用含1 mmol/L EDTA的PBS或CMF洗细胞，再用溶解在柠檬酸盐溶液中的胰蛋白酶消化	一些附着力强的早期传代细胞
5. 先用1 mmol/L EDTA洗细胞，再用1 mmol/L EDTA洗第二次，第二次的溶液保留，1ml/5cm	上皮细胞，尽管有些可能对EDTA敏感
6. 先用1 mmol/L EDTA洗细胞，再用含1 mmol/L EDTA的0.25%的胰蛋白酶消化	附着力强的细胞，特别是一些上皮细胞和肿瘤细胞（注意，EDTA可能对某些细胞有毒性作用）
7. 先用1 mmol/L EDTA洗细胞，再用0.25%胰蛋白酶和200单位/ml的胶原蛋白酶[a]（溶解于PBS或柠檬酸盐或含EDTA的PBS溶液）消化	细胞较厚或多层时，特别是胶原蛋白合成量较多的细胞

续表

8. 刮	可以用于所有细胞，但是会造成机械损伤，而且不会产生游离的单个细胞
9. 在培养基内加入中性蛋白酶（0.1～1.0 mg/ml）或链霉蛋白酶（0.1～1.0 mg/ml），温浴到细胞剥离	可用来分离多种细胞，但是需要离心除去由于血清存在而失活的酶，这些酶可能对某些细胞有害

a 消化用的酶有许多不同的纯度，比如，粗纯化的 Difro 1:250的胰蛋白酶或 Worthington CLS 级的胶原蛋白酶，其中含有一些对细胞剥离有帮助但对其他细胞有毒性的酶。如果需要，可以开始时使用粗纯的酶，接下来的步骤中再使用高纯度的酶。较高纯度的酶可以较低浓度(mg/ml)使用，它们的比活力较高。(Freshney 1994；Wiley-Liss, Inc.)

贴壁细胞的分瓶

1. 从细胞单层吸出培养基。
2. 缓慢加入 37℃ 温浴的 PBS 或不含血清的培养基，让培养基沿容器壁流下，注意不要滴在细胞上，以免冲掉附着不牢的细胞。
3. 再吸出 PBS 或培养基。
4. 加入含 0.25% 胰蛋白酶的 PBS，加入量以刚刚没过细胞为宜。
5. 立即吸去胰蛋白酶，停留在细胞上的时间为 10～30s。
6. 室温放置 5～15 min，每隔几分钟用肉眼观察当容器晃动时单层细胞是否产生滑动。如果是，可以进行下一步实验，不是的话，可以在 37℃ 保温 5 min。
7. 加入与开始时等体积的新鲜培养基，并吹打细胞使细胞分散，在倒置显微镜下确认得到的是游离的单个悬浮细胞。
8. 吸出 1 ml 细胞悬浮液至微型离心管中。
9. 对细胞进行计数。
10. 计算出推荐培养浓度的稀释倍数。
11. 吸出适量的细胞至新培养瓶中。
12. 加入适量 37℃ 的新培养基。
13. 轻轻晃动培养瓶，使细胞均匀分散在表面。
14. 把细胞放入培养箱，拧松盖子。

> 可以用不含血清的旧培养基洗细胞几次，以除掉痕量的血清，血清的存在会抑制胰蛋白酶的活性。

> 如果你使用 100 cm 的培养皿，注意区分组织培养皿和细菌培养皿，细胞是不能附着在未经处理的细菌培养皿上。

例如

细胞计数得到 1.0×10^6 细胞/mL，而种子液浓度为 10^5 细胞/ml，最终细胞液的体积为 10 ml，那么原液就必须稀释 10 倍，也就是 1 ml 原液加入到 9 ml 的新培养基中。

悬浮细胞的分瓶

1. 轻轻的摇匀培养瓶中的细胞培养物，吸出 1 ml 到微量离心管中。

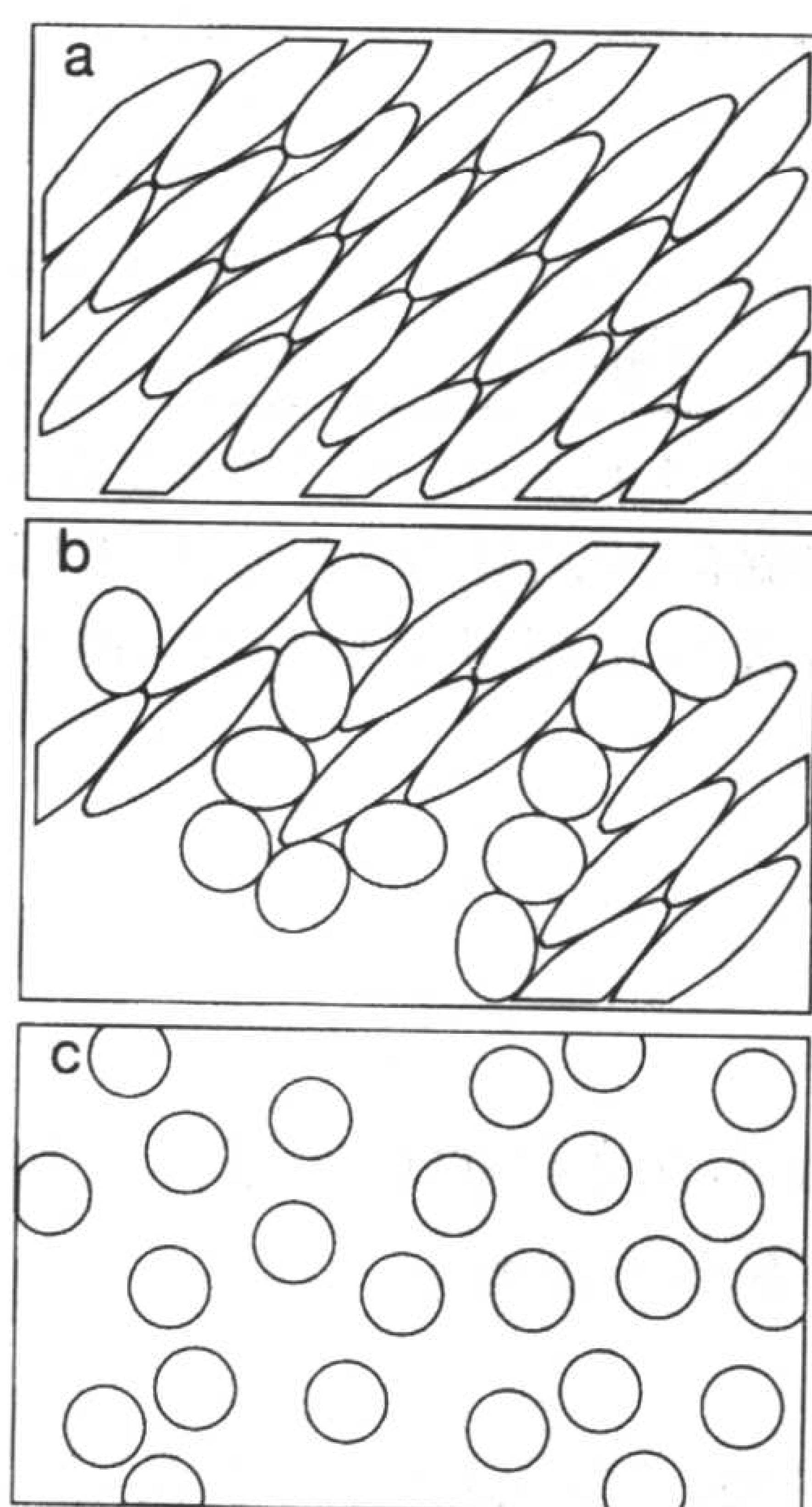


图 10-4 贴壁细胞的剥离

a. 单层细胞呈扁平状，对比度较低。b. 当细胞刚刚从基底上剥落时它们仍旧结合在一起。c. 很快当所有的细胞都剥落下来后，大多数细胞都呈单个游离，这时就可以加入新鲜的培养基了。

2. 对细胞进行计数，同时观察细胞状态。
3. 计算出稀释倍数，决定种子液的量。
4. 吸出适量的细胞到新的培养瓶中。
5. 加入适量的 37℃ 预热的新培养基。
6. 把细胞放入培养箱，并把盖子松开。
7. 继续培养母液培养物，不加入新的培养基。注意每次传代后都要保留原液作为备份，以防传代后的细胞被污染。在培养瓶上标明“备份”，并在下一次传代后丢弃。

在倒置显微镜下观察稀释前后的细胞，应该熟悉每种浓度细胞的分散状态。

例如

细胞计数得到 2.3×10^6 细胞/ml，而种子液浓度为 5×10^5 细胞/ml，最终细胞液的体积为 10 ml。

（$2.3\times10^6=23\times10^5$，所以可以忽略 10^5）

$23:5=10:X$，X 为所需细胞母液的体积。

$X=2.2$

所以在 8.8 ml 新的培养基中加入 2.2 ml 的细胞母液。

活细胞的显微计数

将细胞样品与台盼蓝染料混合。活细胞排斥染料，而死细胞被染成深蓝色。将细胞铺在血球计数器的玻板上，显微镜下进行人工计数。

材料

- 血（球）计数计（改进的 Neubauer 型），每次用后洗净并晾干。（也可以用其他计数器，只是格子不同。）
- 血（球）计数计的盖玻片（可重复使用），每次用后洗净并晾干。
- 含 0.4%（W/V）台盼蓝的 PBS。
- 计数器
- 悬浮好的细胞（既可以是悬浮生长的细胞，也可以是胰蛋白酶处理的贴壁生长的细胞），确认贴壁生长的细胞已经充分游离成单细胞（见图 4），涡旋培养瓶后取代表性样本。
- 移液器、移液头。

测定细胞数目对于维护和冻存细胞很重要，必须学会快速简单地计数，准备好血球计数计和台盼蓝。

库尔特计数计可被用于细胞计数，血（球）计数计计数对简单样本更为实用，并具有实际观察细胞的优势。

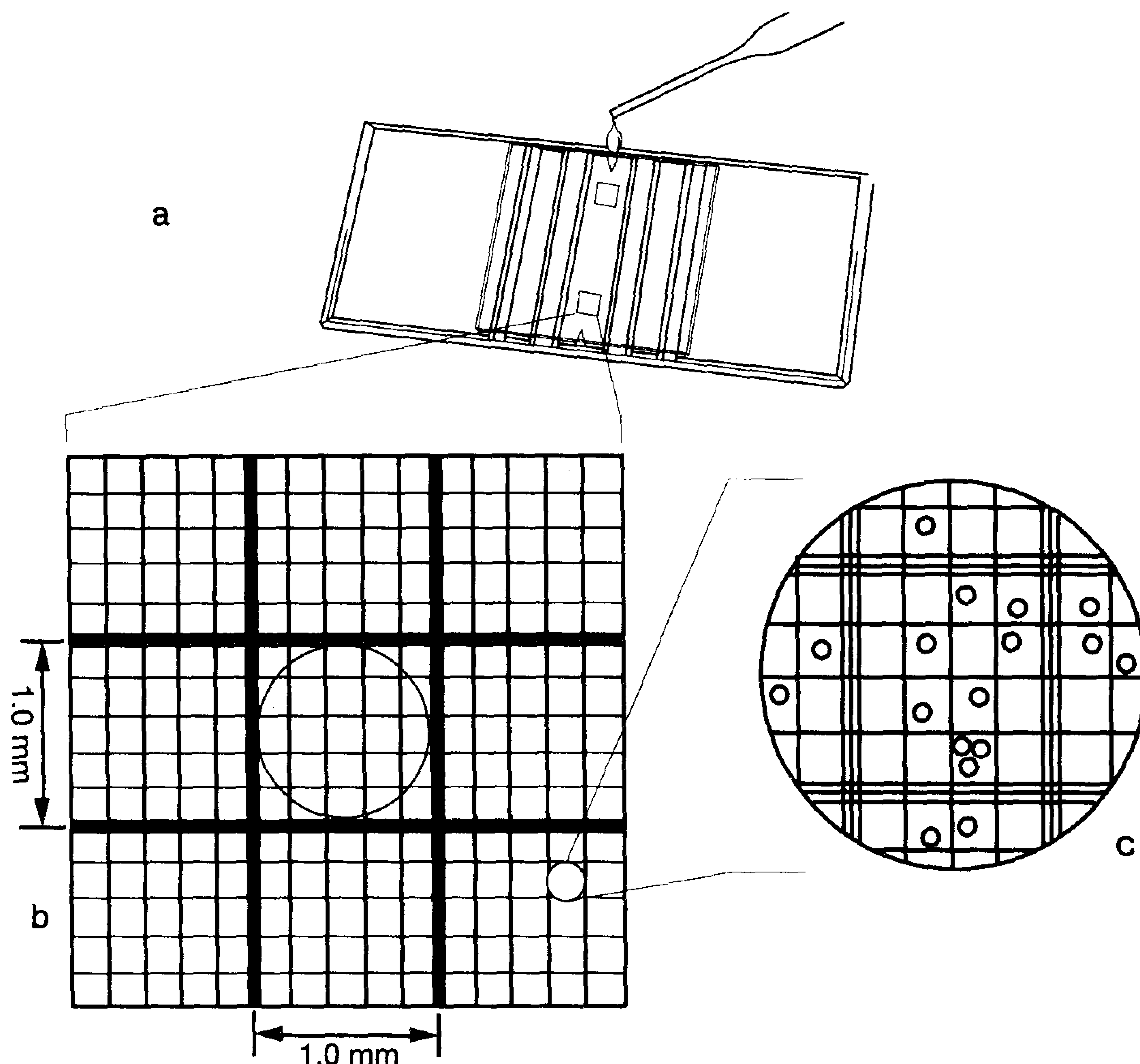


图 10-5　使用血球计数计（改进型）进行细胞计数，细胞计数计中央网格的两侧格室都要铺满细胞

a. 用 10× 的物镜观察（总放大倍数为 100），1 mm^2 的格子可以完全出现在视野内。每个 1 mm^2 的格子被分成了 25 个小格子。b. 25 个小格子的每个又被分成了 20 个更小的方格，以计数小的或稀少的细胞数。c. 用 1 mm^2 的小格子的细胞数计算到每毫升细胞数。

- 微型离心管
- 直立或倒置的相差显微镜，10 倍物镜。
- 待稀释无菌培养基。

步骤

1. 将盖玻片平稳地盖在血球计数计的中间。
2. 取 500 μl 细胞培养液到微型离心管中，如果样品过少就只取 100 μl。
3. 取 50 μl 细胞和 50 μl 台盼蓝混匀。
4. 用移液管取 50 μl 混合液，轻轻地在盖玻片的两边滴上 20 μl，让液体通过毛细管现象吸到载玻片上面（如果有两个样品，可以放置两个盖玻片，并小心地分别滴到盖玻片下，即使只有一个样品也要把计数器的两个计数室都填满）。

> 没有将悬浮很好的或混合很好的细胞加到计数室内是血球计数器不能正确计数的主要原因。

5. 立刻把计数计放到显微镜的工作台上，在低倍镜下固定一个格子计数，只需计数任何一个1 mm^2格子内的细胞数量，就可以换到高倍镜下确保视野中有一个完整的方格。低倍镜下也可以计数，但不容易区分活的和死的细胞。如果使用的是倒置显微镜，要降低物镜以得到足够的光线。

> 如果细胞数小于 30，可以把取出的细胞离心并用小的体积重新悬浮，但是通常不用这样做。数三个格子求平均值即可。

6. 大致确定格子中的细胞（数 25 个小格即可），以决定细胞是要稀释还是浓缩。理想的细胞数量是 30～300 个/mm，如果过多，就以 1∶5或1∶10 稀释，（例如 10 倍稀释，将步骤 2 中 50 μl 细胞悬液与 450 μl 培养基或缓冲液混合，按步骤 3 取 50 μl 细胞液与 50 μl台盼蓝混合）。

> **为了避免同一个细胞数两次，**只计数每个小格子上部和左边的细胞而不计数右边和下边的细胞。每次计数的时候都要遵循同一规则，这样才能保证每次计数的都一样。

7. 计算 1 mm^2 格子内的活细胞数量，死细胞会全部被染成蓝色，而活细胞不被染色（可能会有蓝边）。最好是把两者都数出来，可以计算出活细胞的比例。
8. 计数 3 个不同的 1 mm^2 的格子，得到平均值。
9. 计算出 1 ml 中的细胞数目。

> 如果每次数的细胞数量差别在 20% 以上，说明细胞没有完全分散，或有成团的现象。

平均值×10 000×稀释倍数＝原始样品中 1 ml 的细胞数。

例如

三个格子的细胞数分别为 113、99 和 118，平均为 110。

$$110 \times 10\,000 = 1.1 \times 10^6$$

由于细胞和台盼蓝是等体积混合，稀释倍数为 2，

$$2 \times 1.1 \times 10^6 = 2.2 \times 10^6$$

所以原液中细胞数目为 2.2×10^6 个/ml。

10. 计算出原细胞悬液中活细胞的比例，
计算方法为：（活细胞总数/细胞总数）×100

活细胞的比例小于 80%～90%，说明细胞群体不健康，最可能是细胞过密，也可能是发生了污染或者培养基、血清出了问题。

冷冻和储存细胞

细胞生长时的表型会发生改变或漂变，所以细胞必须计数，计数后应马上冻存。

不幸的是，还不能对多数原代细胞进行冷冻和融化。

☆ 冷冻细胞前

检查冷冻细胞所需试剂和器具是否备齐。

- 参考 ATCC 提供的冷冻特定细胞株的冷冻配方。
- 当然，也可以参考实验室常用的冷冻细胞试剂和条件，但这不一定是最适条件，同时要注意这些条件可能并没有参考 ATCC 或其他文献而只是参考了日常实验时的条件。
- 如果得到的是一株新细胞，找出原始文献的作者，向他询问。
- 如果找不到有关资料，参考下述的冷冻方法。

确认有无菌的可用于冷冻的安瓿瓶（冻存管）。这种瓶子带有螺旋的塑料盖，并且可以耐受低温。它们可能是平底或圆底的，两种都可用来冻存（你可能会偏爱可以用来离心的平底管）。也可以用玻璃制的安瓿瓶，但一定不能使用像 *Eppendorf* 管盖子那样的微型离心管。

确认液氮罐里有你冻存细胞的位置。因为液氮罐里的空间十分拥挤，找一个合适的架子存放，如果乱放会被别人当垃圾丢掉。

细胞太少，复苏后细胞可能会不长；细胞太多，可能会不健康。

冷冻细胞

1. 将培养基中的细胞培养至对数生长期。
2. 进行活细胞计数，不要冻存死细胞比例高达 20%以上的细胞。
3. 决定冻存量，安排需要几个安瓿瓶。每个安瓿瓶内只能装 1 ml 的液体，细胞量最好在 1×10^7 个左右（或 4×10^6～2×10^7）。

冻存细胞在融化时要稀释 10 倍，而稀释后的液体是 5× 的种子液。
例如：如果种子液的密度为 5.0×10^5 个/ml，那么融化后重新悬浮细胞时细胞的密度为 2.5×10^6 个/ml，所以冻存细胞时的细胞密度为 2.5×10^7 个/ml。

4. 准备好冷冻培养基，分装成 1 ml，冻存培养基通常包括一般培养基、10%～20%血清、5%～10%的甘油或二甲基亚砜。如果你不清楚该用什么，那么就使用 20%的血清和 10%的二甲基亚砜。
5. 在冷冻培养基中用移液管小心吹打粒状沉淀。
6. 每个安瓿瓶中分装 1 ml 冻存培养基，放置在冰上操作。
7. 把安瓿瓶放入冻存盒中，做好标记，放入 －60℃ 或

每个安瓿瓶上都要做好标签，即使你用了一盒。记明细胞类型、传代数量、细胞数、冻存时间、冻存人。不要使用带状标签，低温下它会变脆并容易断掉。使用实验室用的永久型记号笔（不会被酒精擦掉）直接写在安瓿瓶上。

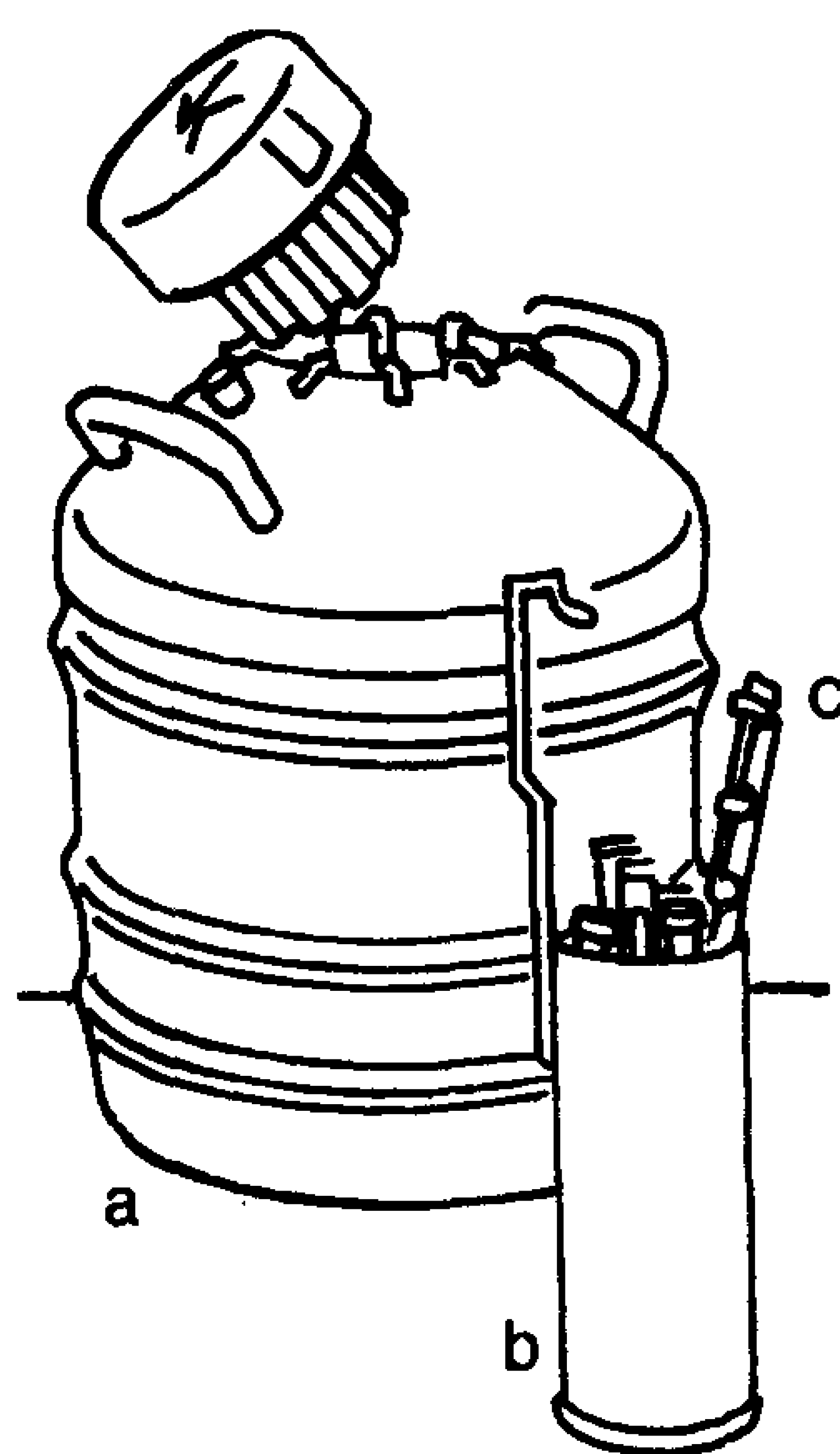


图 10-6

a. 液氮罐；b. 小罐；c. 放置安瓿瓶的架子。移去液氮罐的盖子，抓住小罐的钩状把手把它提出来。从小桶中提出你要用的长架子，把冻存管拿出或放入，然后马上放回液氮中，盖好盖子。操作过程要戴好手套和保护面具。

更低温度的冰箱，放置 16～24 小时。

8. 倒些液氮至冰盒内，把细胞从冰箱转移到液氮罐之间要把细胞放在这样的冰盒内。如果没有现成的液氮，那么把细胞放在干冰上。

9. 将细胞放置在合适的位置，立即在记录本上做好记录。

☆ 液氮的使用

- 细胞常常保存在液氮罐或是液氮制冷柜中，但是要每隔几个星期补充液氮。
- 自动填充液氮的罐子，必须定期检查，以保证管道的畅通以及液氮罐没有空掉。
- 在操作液氮罐内容器时要戴好厚手套，否则会冻伤手臂。
- 从液氮罐内拿出细胞时至少也应戴上乳胶手套。
- 不要在液氮罐内悬吊物品，也不要吸入气化后的液氮，用手挥开液氮后，就能看见液面了。
- 戴好保护眼睛的眼罩，以免操作冻存管时，冻存管爆炸溅伤眼睛。
- 决不能把没有拧紧的管子放入液氮中，而且要提前找负责液氮罐管理的人员确定位置，不要乱放。
- 不要关闭警报，定期检查。
- 如果听到了液氮罐的报警声，立即通知实验室管理人员。如果是周末或凌晨，则先检查确认是否是由于液氮面过低或温度过高引起的报警，再联系负责液氮罐的人员。

> 如果使用可以设定程序的冰箱，把程序设置成 -60℃前，每分钟降低 3℃。

> 当液氮比较少时，不要打开，要尽可能的保证容器内的低温。

污　染

发生污染。既耽误时间又是一个灾难，熟练的无菌操作能避免许多问题，但早期检测污染是一种可以预警的方法。对于培养箱中的每瓶细胞都要注意观察。要养成习惯，每次打开培养箱时，迅速看看有没有发生污染。

> 如果发现别人的培养瓶发生了污染，立即通知他。

细菌、酵母、真菌、霉菌、支原体以及其他的培养细胞都可能引起污染。

怎样识别污染

☆ **肉眼观察**，把培养瓶或培养皿拿起来，对着光线检查。

- **浑浊情况。**即使细胞密度很高，培养基也应该是透明的。轻轻移动或晃动培养瓶，观察培养基的浑浊或悬浮情况，一些霉菌可能会在培养基的表面形成菌落。
- **培养基颜色的变化。**酸性条件下，加了酚红的培养基会由红变黄，而碱性条件下会变成红紫色。细菌污染常常会使培养基变成黄色，真菌污染会使培养基变成深紫红色。

> 丢掉细胞以前要仔细检查一下，快速生长和生长过量的细胞培养基也会变黄。当培养箱中 CO_2 的浓度变化时培养基的颜色也会变成黄色（CO_2 浓度太高）或是粉红色（CO_2 浓度太低）。

- **闻！**当然不能打开瓶子去闻，把鼻子贴在瓶口闻，许多污染发生以后都会散发出易察觉的、特殊的气味，甚至一打开培养箱门就闻到了。

☆ **显微观察。**在倒置显微镜下，先用低倍（10×）再用高倍（40×）物镜（总放大倍数为 400）观察细胞培养皿或培养瓶中的细胞：

> 不要把运动性和布朗运动混淆，所有的颗粒都会前后左右的轻微振动。有些细胞也可能会像细菌那样轻微地振动。

- **其他有机体。**在低倍镜下，真菌的菌丝体成长棒状，并横穿整个视野，还可以观察到酵母，有时呈小圆球形，有时还有芽。

  在高倍镜下可以观察到细菌，它们可能是棒状或球状，单独成链或成团存在，它们也可能和细胞混在一起，并且明显处于细胞内部，有些细胞可能已经裂解变得模糊。观察时可能每两个视野才出现一个污染（当然也算被污染了！），而且可能污染物是可以运动的。

- **损伤细胞。**感染会杀死细胞，可能导致每个细胞都裂解和/或细胞层从附着物上完全剥离，更可能的是细胞变得不规则（或大或小），在低倍镜下是黑色的粒状。

> 除非你的细胞是很稀少或是再也得不到了，是可以运动的。通过不加抗生素挽救它们！把污染的细胞扔掉！

悬浮培养细胞比贴壁培养细胞更加难以显微观察，尤其是高倍显微镜下。

- 将培养瓶或培养皿放在显微镜的载物台上，静置一会。
- 将焦距对准器皿的底部，观察那些轻微附着的细胞，因为它们可能已经接触到了微生物。
- 对准整个培养瓶焦距，当发现细胞的时候，用细聚焦调节旋钮调节，仔细检查周围的培养基有没有污染发生。

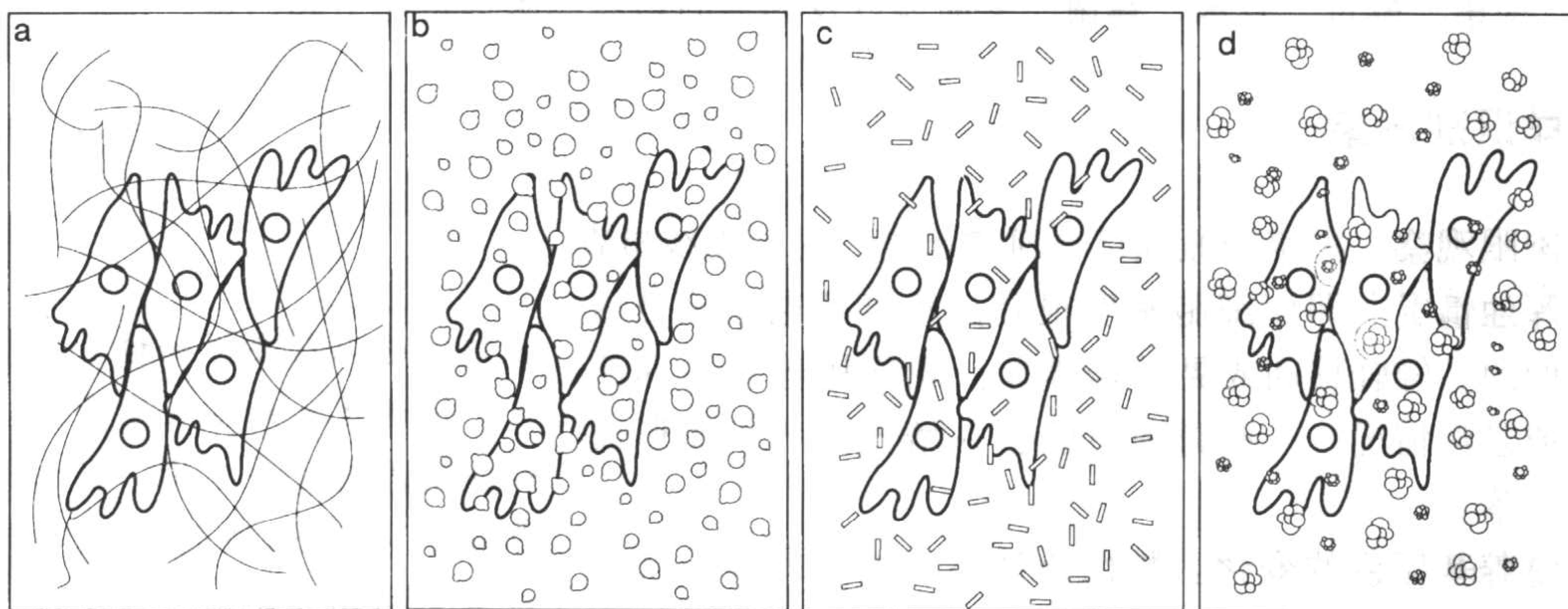


图 10-7　倒置显微镜放大倍数 400 倍下观察到的贴壁细胞被污染的情况

a. 霉菌；b. 酵母；c. 细菌，小的棒状；d. 细菌，成团的球状，有些细菌已经进入细胞内部。

如果你不能确定是否发生了污染

1. 制作湿涂片或染色片（见第 16 章）。取 1 ml 培养基离心，用 50 μl 培养基或缓冲液重新悬浮细胞，滴一滴到载玻片，盖上盖玻片制成湿涂片；或涂片、固定并染色（甲基兰或革兰氏染液），在高倍镜下观察。
2. 将细胞在营养培养基或血琼脂培养基上划线，37℃ 培养 3 天。如果有菌落，那么细胞被污染了。
3. 取 1 ml 的细胞培养液至无菌的微量离心管中，37℃ 培养 3 天。观察到浑浊物，做湿涂片显微镜观察。

支原体污染

☆ **识别支原体污染**。这是一种很难发现却经常存在的问题。支原体是最小的（0.3μm）能够自我复制的有机体，倒置显微镜下通常观察不到。支原体没有细胞壁，对常用的抗生素不敏感。支原体感染是极为不易察觉的，可能直到出现了可以观察到的病变或发现细胞正常功能丧失的时候，才意识到是发生了支原体感染。

> 最常见的感染支原体的途径是细胞株被支原体感染。所以在得到细胞株后要进行测试，不要冻存没有测试过的细胞。

不采用特殊的染色方法，也没有观察到病变但

是实验总是不成功，就应怀疑被支原体污染。预防支原体污染的惟一途径是经常对细胞进行筛选。

☆ **防止支原体感染**。只使用那些证明没有污染支原体的血清和培养基，许多公司都作出了这样的保证。只接受那些保证没有支原体感染的细胞，通过商业的手段得到细胞很容易做到，但是从别处索要时就一定注意，要直接询问他是否验证过没有支原体感染。

对细胞进行日常的筛选是很重要的。虽然这样做很麻烦，但当你怎么样也得不到一种细胞表面蛋白的抗体，或不能有效地表达某种蛋白质时，可能是由于一直在使用被支原体感染的细胞。

☆ **检测支原体感染**。如果这株细胞对你十分重要，那么就应该每4～6周对细胞进行检测，通常使用下面几种方法：

- **支原体的荧光染色**是最简单、最便宜也是最常用的方法。
- **使用支原体的特异引物进行PCR检测**。如果实验室具备PCR仪和电泳条件，那么这种方法可能是最简单的手段。可以自己设计引物（设计好恰当的对照），也可以从公司购买引物。
- **把细胞样品送到能进行支原体检测的公司检测**。这样做虽不如自己检测快（尽管托给公司比较容易，但会很贵），但你不需要自己动手。

☆ **如果你发现了支原体污染……祝你好运！**

- 最好的方法是立即把细胞丢弃，从新复苏。
- 可以不理会它。
- 可以采取某些挽救措施，但是会很困难，只适用于那些不可代替的细胞。最简单的方法是订购除去支原体的试剂盒，像ATCC等都有有效的试剂盒，和这些公司联系咨询他们的意见。

> 大多数不做细胞实验的实验室都认为“如果没有损坏就不要维修”。但是支原体污染可能会造成不易察觉的细胞功能变化，它们会产生染色体畸形、使细胞特征降低、支持病毒生长能力下降等。

交叉污染

细胞还可能被别的细胞污染，这种交叉污染可能更广泛，许多实验人员在不经意之间培养、使用和冻存了其他的细胞。

这种污染是可以避免的。

- **只从有保障的地方得到细胞**，或者自己检查细胞，有许多的公司也可以检查。
- **不要同时操作多株细胞**。不要把多种培养瓶同时放在超净台内。
- **不要使用同一个移液管**操作多种细胞。
- 不同细胞株**不要使用同一瓶**培养基或胰蛋白酶。
- 操作后**不要把移液管放回培养基的瓶中**。
- 培养维护时，**使用栓塞式移液管**。

如果你的细胞生长情况或功能突然发生了变化，在排除支原体污染后，检查你的细胞是否发生了交叉污染（这些变化也可能是发生了突变或漂变）。

CO_2 培养箱和储气罐

CO_2 用来调节开放系统中培养基的 pH 值，CO_2 以罐装的压缩气体形式购买，通过压力阀控制释放到培养箱中。培养箱上有可以显示 CO_2 浓度和箱内温度的显示屏。

CO_2 培养箱

- 不要随便把细胞放入培养箱，除非你已经问过培养箱其他的使用者。
- 培养箱中的不锈钢盘盛水，是为了防止培养基干掉，另外，CO_2 探头只能在湿润的条件下工作。保证不锈钢盘内装满无菌蒸馏水，而且每星期更换一次。不要在水里添加抑菌剂，因为它会损害不锈钢。

> 不要使用次氯酸钠和其他含氯的漂白剂擦拭架子，因为它们对细胞有毒害作用。

- 经常清洁支撑培养器皿的架子，这样做对防止污染有帮助。至少每星期用 70% 乙醇清洁一次，每个月灭菌一次。
- 尽量减少开关培养箱门的次数，拿出细胞后要随手关门，温度和 CO_2 浓度的波动对许多细胞生长都不利。
- CO_2 浓度太低时，培养箱会发出警报。
- 大多数培养箱的温度都设定在 37℃，但有些不是，使用前要检查，当温度高于或低于设定值会发出警报，重新设定温度。如果培养箱要修理，准备好一个备用的。

> 在没有与所有实验室人员磋商情况下千万不要改变培养箱上的设定。

- 培养箱的架子上通常还会放置一个温度计，核对温度计读数和培养箱显示器上的温度读数。小心不要打坏了培养箱中的温度计，大多数精密温度计是水银制的，如果培养箱被水银污染了，那么它可能再也不能用来培养细胞了。为了精确记录培养箱的温度，要把温度计放在贮满水的烧杯中，再放入培养箱内。
- 当水套层缺水时蜂鸣器或警报器会响，水套层用来保持培养箱中的温度，用软管把去离子水（不是蒸馏水）注入水套层，不要添加抑菌剂。如果培养箱没有警报器，那么在培养箱顶部观察到凝集现象也说明水套层缺水。
- 大多数培养箱设定的 CO_2 浓度是 5%，但是也要根据不同的培养基和细胞而定。
- 培养箱上的 CO_2 含量读数可能不准，所以当培养基的颜色改变时，要用 Fyrite 气体分析仪精确测定培养箱中的 CO_2 浓度。

☆ **用 Fyrite 气体分析仪测定 CO_2 浓度。**富赖特气体分析仪（Bacharach, Inc.）使用气体体积分析法来测定化学溶液吸收 CO_2 的量，它通过吸气泵将样品吸入分析仪中。

将气体分析仪放在硬塑料的容器中，分析培养箱中的 CO_2 浓度只用 30s。

> 如果培养箱使用的 CO_2 用完而你又没有其他培养箱的时候，不要打开培养箱的门，在不开门的情况下箱中的 CO_2 还可以维持一天。

1. 垂直拿好 Fyrite 气体分析仪。

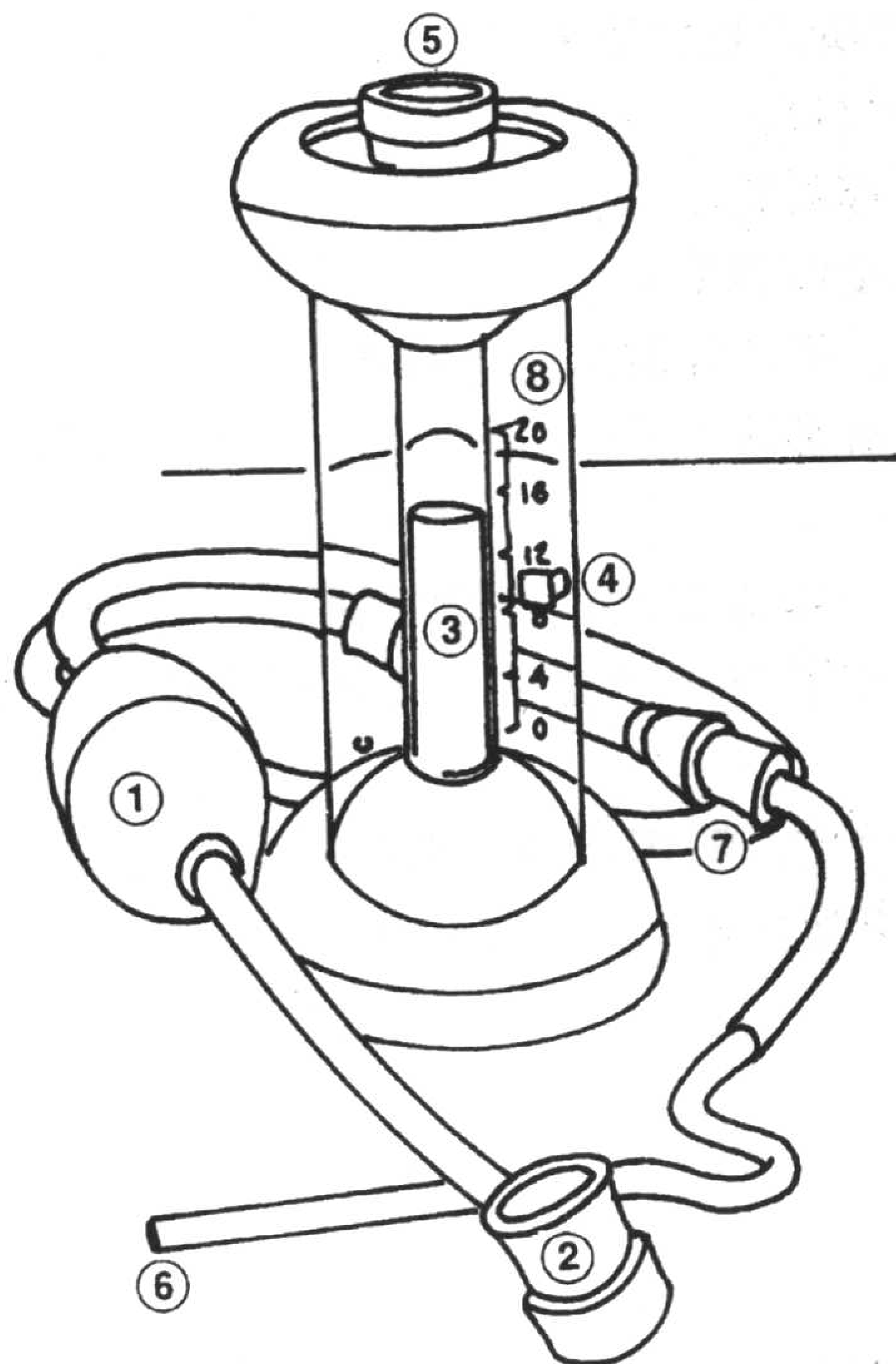


图 10-8　Fyrite 气体分析仪

① 吸气球；② 接头；③ 液体；④ 防滑螺栓；⑤ 活塞；⑥ 样品管；⑦ 饱和过滤器；⑧ 刻度。

2. 远离脸部，按下活塞释放出探测器。
3. 倒转仪器，使顶部的液体流干。
4. 将仪器拿平与眼同高，松开刻度仪后面的螺栓，调整刻度，直到液面与零刻度线等高，旋紧螺栓。
5. 把取样器的软管与培养箱的取样口相连，不要立即取样，待取样管内的空气排净后再取样。

> 富赖特气体分析仪溶液的表层漂浮的一层深红色的液体是正常的，加入它是为了防止产生泡沫，而影响弯液面的读数。

6. 保持仪器水平，将样品管的橡皮接头与活塞阀相连，并挤压吸气球几下。
7. 倒转仪器，将液体从顶部排干，再正放使液体从底部排出，重复一次。
8. 将仪器 45°放置，使液滴排到底部。
9. 将仪器垂直放置，使液面平稳，从液体的体积上判断出 CO_2 的百分含量。如果等待的时间太短如 5～10s，那么读数可能会稍微的错误，而耽搁时间过长，结果的偏差就会更大。
10. 重复步骤 6～10，直到连续两次读数相同。
11. 将仪器的软管从培养箱的取样口上取下，并接上 CO_2。

使用气体分析仪的注意事项

仪器中用于吸收和测定气体的化学物质是氢氧化钾，被染成了红色。氢氧化钾有腐蚀性和毒性，如果溅到皮肤上，先用水冲洗再用醋酸冲洗。如果溅到眼睛，用

水冲洗后再用 5%的硼酸冲洗，找医生帮忙。

- 当活塞压缩时不要倒转仪器。
- 当活塞被压到底时不要靠近脸。
- 总是抓住安全冀防止热量传到手上。
- 取样时保持过滤器潮湿，不这样做测定会不准。
- 为获得最大精确度，仪器必须在环境温度工作，不要将仪器放在激烈温度处，如窗台。
- 检查仪器液体的强度。一次读数后不要排出样品，再次倒转仪器，重复一次读数。如果第二次读数增加了 50%或更多，必须调换液体。按生产商的要求，新鲜液体适合 350 次样品。
- 仪器倒置或处于垂直位置时，应该补加或调换液体，使零刻度到液体柱的顶部。加液体时保持仪器倒置并压活塞，一次加数滴干净的水。倒去液体，查阅手册或生产商的说明。

CO_2 储气罐

- CO_2 储气罐用来存放压缩的 CO_2 气体，它和培养箱相连并通过培养箱来调节流量。
- CO_2 储气罐看起来十分复杂，其实只要小心认真操作是没有危险的。
- CO_2 储气罐通常由系里统一管理。罐是租的，所以空瓶要立即送回以减少租金。
- CO_2 储气罐顶上圆柱形的帽子用来保护开关不受外界机械和气候的损伤，只有接到培养箱上时才能摘下。
- 大多数培养箱都带有自动调节的 CO_2 储气罐，是一个在箱顶的小罐。这套系统可能显示并调节 CO_2 的量，当 CO_2 储气罐空了会报警，当 CO_2 在培养箱内积累到有害浓度时会切断 CO_2 的供给。

使用压缩气体时一定要小心。CO_2（氩气、氦气、氮气等）是惰性的、无色无味气体，但是在密闭或通风不好的地方会引起窒息甚至死亡还会冻伤眼睛和皮肤。如果操作不当，压缩气体罐是会发生爆炸。

调节阀

罐内保存的气体处在危险的高压情况下，调节阀可以降低气体的压力，使其能够被安全使用。

- 气压调节阀有两种基本类型，一级和二级，它们看起来是一样的，只是二级调节阀可以在更加苛刻的条件下提供稳定压力的气体。
- 大多数调节阀有两个仪表盘，一个显示罐内的压力，另一个显示输出的压力。

仪表盘上刻度比较小的是用来测量输出的压力，刻度比较大的是用来测量罐内的剩余压力的。

- 有些调节阀并不适合所有罐子，这是为了避免不相容的气体发生交换。如果调节器

不合适，不要勉强。

- 有时几个罐通过许多管子连在一起来保证大量持续的气体流动，通常几个（4 个以上）罐子是通过一个调节阀控制来避免拆装和节约时间。但是经常有实验室使用一个 CO_2 储气罐为多个培养箱服务，这种作法很容易出问题。

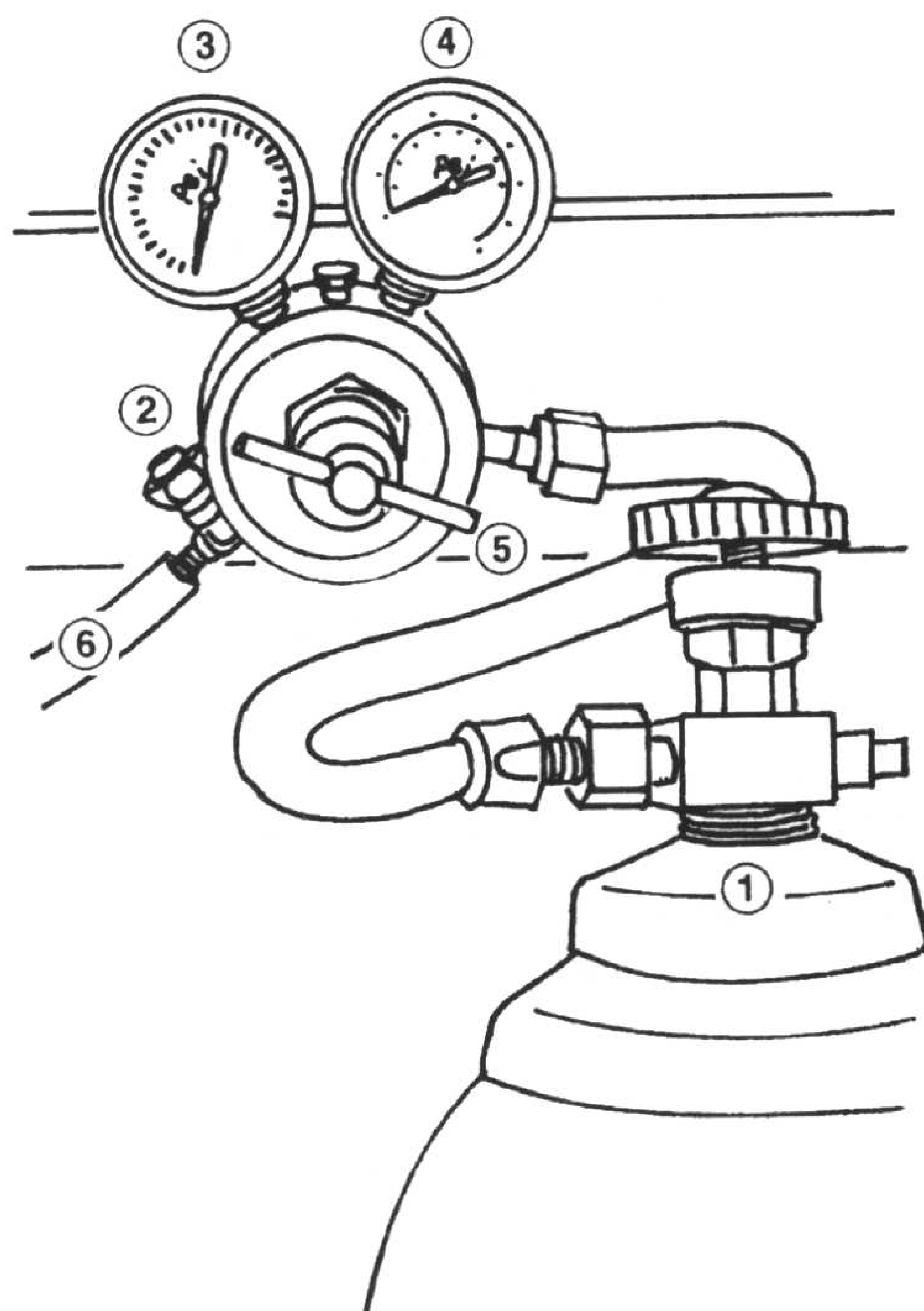


图 10-9　压力调节阀

罐的阀门；② 流量控制阀门；③ 输出压力指示；④ 罐内压力指示；⑤ 压力调节旋钮；⑥ 接培养箱的管子。

使用压力罐的注意事项

- 移动和贮藏罐时，确认盖子处于安全位置。
- 移动大的压力罐时，确认已盖好并固定在特制手推车上。
- 所有的罐都必须固定好，以防跌落。
- 不要将压力罐暴露在 50℃ 以上的环境内。
- 不要使用不能确定内容物的罐子，不要单纯地根据管子上的颜色判断内容物。
- 使用适当的调节阀，不要随意的更换。
- 不要给罐的开关加润滑油、修改甚至加压等，不要拧松或拿下安全阀和安全片。
- 快速释放压缩气体也是十分危险的，有可能产生火花点燃可燃的气体。
- 不要把气体完全放完，保留一点可以防止污染。
- 不使用时，罐子的阀门必须拧紧。
- 不要订多余的罐，它不仅仅是个安全隐患而且每天还要付租金。
- 将调节阀从空罐子上取下，盖好安全帽，标明已用尽，送回领罐处。
- 不要使用已经损坏或腐蚀的，或是距上次安全检查已经 5 年以上的压力罐，把它退回卖主处。

- 有些气体是可燃的（乙炔、丁烷、乙烷、氢、溴化甲烷、丙烷）、有些是很活跃的（氧气）、有些是有毒的（二氧化硫、氨、氯），所以在使用这些气体前要仔细阅读安全说明。

☆ **怎样更换接在培养箱上的 CO_2 储气罐**

1. 关上空罐的阀门。
2. 盖好盖子。
3. 放好新罐并固定。
4. 连接新罐和培养箱。
5. 逆时针方向旋动压力调节螺栓，使得气体释放自由。
6. 打开 CO_2 罐的阀门，直到仪表盘上指示出罐内的压力。与供应商提供的压力数据相对比，如果不一样，说明阀门可能漏气。
7. 关闭流速调节阀门，顺时针旋转输出压力调节螺栓，直到所需压力（参考培养箱使用手册）。

气体流速可以通过调节阀门来改变，也可以通过安装在调节器管道下游的输送阀门来控制。**调节阀本身不能用作通过调节压力来获得不同的流速调节气流。这会破坏压力调节阀的作用。**

（郝肇菁　王维荣　黄伟达）

参考文献

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., and Walter P. 2002. *Molecular biology of the cell*, 4th edition. Garland Publishing, New York.

American Society for Cell Biology (ASCB).
http://www.ascb.org/
Phone: (301) 347-9300

Bacharach, Inc. 1980. FYRITE instruction manual #11-9026. Bacharach, Inc., Pittsburgh.

Banker G. and Goslin K., eds. 1998. *Culturing nerve cells*. 2nd edition. MIT Press. Cambridge.

Bioconcepts 3 (2):6. 1997. *ICN Biomedical research products*, vol. 3, p. 6. ICN Biochemicals, Costa Mesa, California.

Forma Scientific. 1990. Water-jacketed incubators. In *Instruction manual #7043158*. 1990. Forma Scientific, Inc., Marietta, Ohio. (This contains all information on the use of the Fyrite.)

Freshney R.I. 2000. *Culture of animal cells. A manual of basic technique*, 4th edition. Wiley-Liss, New York.

Gershey E.L., Party E., and Wilkerson A. 1991. *Laboratory safety in practice: A comprehensive compliance program and safety manual*. Van Nostrand Reinhold, New York.

Harlow E. and Lane D. 1988. *Antibodies: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

———. 1999. *Using antibodies: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Hay R., Caputo J., Chen T.R., Macy M., McClintock P., and Reid Y. 2003. ATCC *Catalog of cell lines and hybridomas*, 9th edition. American Type Culture Collection, Rockville, Maryland.
12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852-1776.
Phone: 1-800-638-6597
Fax 1-301-2331-5826

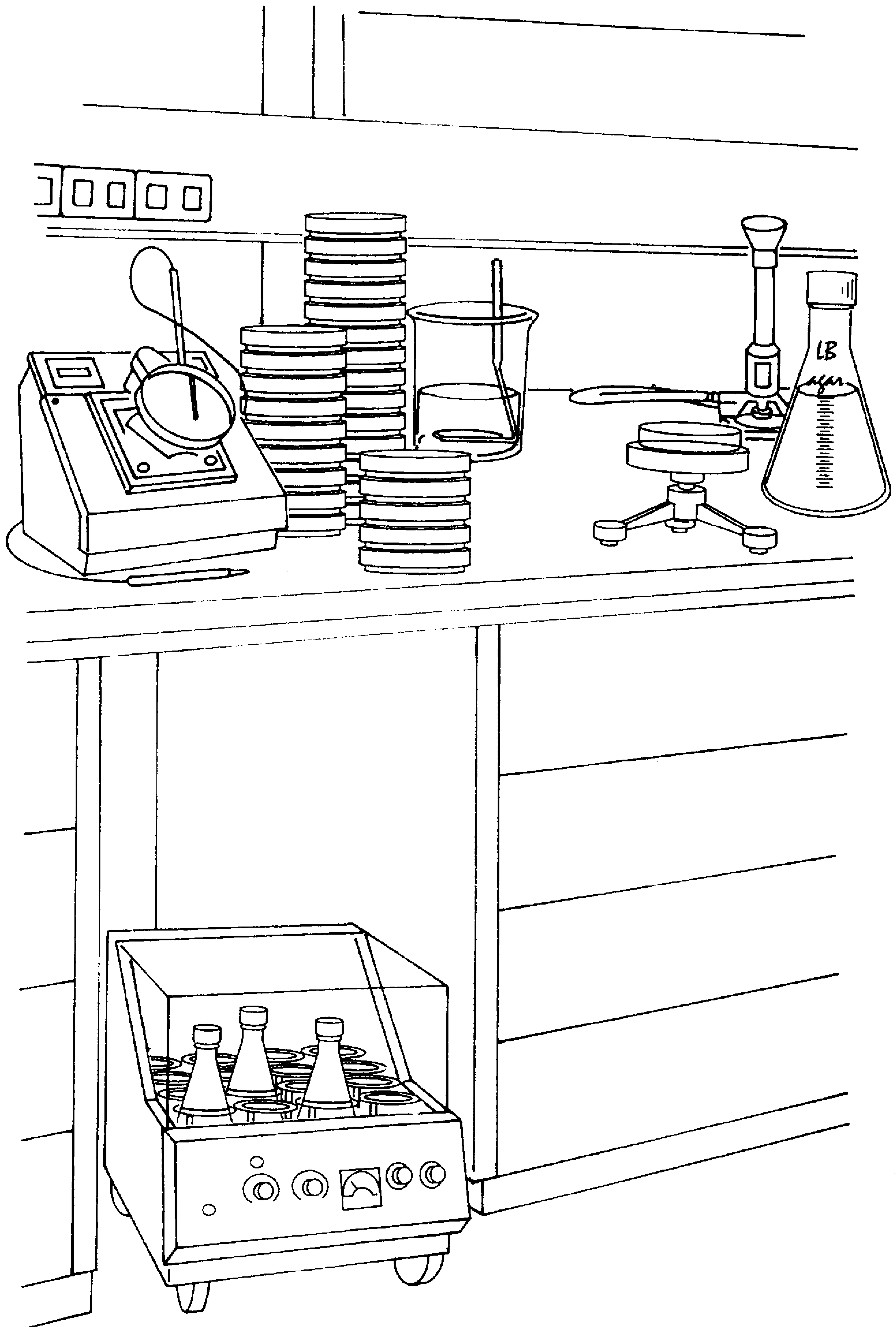
Heidcamp W.H. 1995. *Cell biology laboratory manual.* Gustavus Adolphus College, St. Peter, Minnesota.
http://www.gustavus.edu/~cellab/index-1.html

Kirsop B.E. and Doyle A., eds. 1991. *Maintenance of microorganisms and cultured cells. A manual of laboratory methods*, 2nd edition. Academic Press, New York.

Minimizing the Risk of Transmitting Animal Spongiform Encephalopathy Agents via Medicinal Products, 5.28. 2001. European Directorate for the Quality of Medicines.
http://www.pheur.org

Richmond J.Y. and McKinney R.W., eds. 1999. *Biosafety in microbiological and biomedical laboratories*, 4th edition. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Protection, and the National Institutes of Health. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmbl4/bmbl4toc.htm

Veile R. 1990. *Appendix: Operation and maintenance of Nuaire incubators.*
http://hdklab.wustl.edu/lab_manual/12/12_10.html


LB
agar

第11章 细　　菌

你可以把细菌看成是自然的一种形式，去研究它们如何生长，为什么会引起疾病，繁殖时它们需要什么等等。你也可以把细菌看作仅仅是一个储存酶的袋子，用来进行基因操作和蛋白质的表达。因此要小心，细菌作为一个活的实体，必须好好地培养和正确地处理，才能得出清晰可靠的结果。

建立实验

你能够在实验台上做大多数的工作。微生物可以根据它们感染个体和引起疾病能力的范围来进行功能上的分类，这种分类会影响操作特定微生物的方式和地点。

分子生物学常用到细菌，如非致病性的大肠杆菌和枯草杆菌，是1级的（不致病），以及一些沙门氏菌和志贺氏菌的2级（低致病性）。许多目录都不区分1级和2级的微生物，可以在实验台上完成大多数的操作（BL1），以及在生物安全橱内进行可能产生气溶胶的操作（BL2）。

对于3级（高致病性，可通过吸入致病）所有的操作必须在有BL3级安全措施的实验室内进行。3级微生物有结核分枝杆菌（*Mycobacterium tuberculosis*）、牛分枝杆菌（*Mycobacterium bovis*）和土拉热弗朗西斯氏菌（*Francisella tularensis*）。这类安全实验室必须与周围的房间成物理隔离状态，它们之间不允许通过门或通气管等产生气体交流，而且这种实验室是处在负压状态下，即使是一切防护措施都无效，空气也只能从外面流进，实验室内空气不能流出，所有操作都必须在超净台内完成，必须穿防护服，所有的出入都要控制。

如果要使用3级防护微生物，需要提前一个月和环境健康与安全部门打招呼。在BL3型安全措施的实验室内工作是要经过训练的，许多常规操作都要被严格控制。进出这样的实验室要用钥匙或门卡控制，在使用前所有人员都要经过确认。不要想通过借钥匙来逃避确认，因为你和借钥匙人都可能会被禁止再次进入。

所有的3级防护微生物，不论是密封的还是冻干的，都必须储存在BL3设施内，冰箱和液氮罐内不能用作它们的临时存放处。

最高级别的BL4级安全实验室用来操作那些会对个体和社会造成巨大危害的4级微生物。大多数4级微生物都是节肢动物传染病毒、沙粒病毒和线状病毒，在这种实验室工作要国家批准才行。

本手册涉及到的都是1级和2级微生物。

见第9章无菌操作中的关于生物危害分级和所需设备的描述。

☆ **实验台**

- 操作包括：
  筛选突变体
  培养有机体

测定细菌的浓度
离心培养物
转化
抽提质粒
这些操作都可以在实验台上完成。

- 在建立实验台的时候，参照第 3 章所描述的典型实验台的布置。你可能会在无菌的条件下工作，所以要尽量减少动作和保持清洁。
- 需要一个涡旋振荡器，一个本生灯和抽气装置。
- 所有接触过大肠杆菌和其他微生物的垃圾都是生物危害废物，要把培养时使用过的废物分成：锋利的、液体废物、固体废物和放射性废物等几类分别处理。

另外，你可能还会用到

- 培养箱或温室，设定为 37℃，对于某些细菌可能需要不同温度的培养箱。
- 摇床、温室中的振荡器或轮状培养器，用于有氧培养大肠杆菌。
- 离心机：微型离心机和高速离心机。

一些有用的设备

- 生物安全橱，用于倒平板、过滤培养基和抗生素。
- 电穿孔仪，用于转化细胞。
- 分光光度计，用于检测生长情况。

操 作 规 则

- **遵守最通常的实验室安全守则**（见第 1 章）。不在实验室内吃东西、喝水，不用嘴吸移液管移取液体，不穿露脚趾的鞋，不把实验服穿到实验室外面。
- **每天最少清洗一次实验台，每次细菌液溅出后要立即打扫。**早上实验前先用清洁剂如 70％乙醇把实验台擦拭一遍，立即擦掉那些溢出的菌液，以免污染环境。
- **丢弃可能传染疾病的废物前要清除污染。**
- **接触可传染的物质后，在离开实验室前都要洗手。**即使是带手套实验，也要洗手，因为可能有人把细菌留在了电话、门把手、电脑键盘以及笔上。

> 所有接触过细菌的物质都有可能传染疾病，都是有生物危害的。

液体废物

加入次氯酸钠至终浓度 10％，放置 30 min 后再倒入下水道，大量水冲洗。

固体废物

当作有生物危害的物品处理，高温高压灭菌后丢弃，这是一个实验室或是系的责任而且必须注明（见第 8 章）。

- **实验中尽量避免产生气溶胶**。避免产生气溶胶是减少通过肺部感染细菌和引起污染的最好方法。气溶胶常常通过那些破坏性的实验步骤产生，如使用去垢剂裂解和超声波处理，移液、倾倒以及打开离心管的动作也会产生。不要猛地打开离心管，倾倒时要避免飞溅。移液管的尖头靠近液面排出最后一些液体或气体都会减少飞溅。
- **不要积累培养皿和试管**。得到细菌后，保存后并丢掉原来的样品。冰箱里放置旧培养基的地方也是重要的污染源，它们会积累霉菌、杆菌等微生物。

"只是大肠杆菌嘛……"错！千万不要认为大肠杆菌很容易培养就掉以轻心。关于它的安全条款可能是比较少，但是作为一种良性的微生物它对那些免疫力差的人的影响还是存在的。同样，实验中的污染——特别是被其他株的大肠杆菌污染，可能会把你的实验弄的一团糟，尤其是实验技术还不过关时。所以要小心对待所有的细菌。

获得细菌

细菌的菌株可以从以下途径获得：

- **实验室成员**。实验室中有人使用同一种细菌，可以从他那里得到。最好是能够要到冻存的样品，但不要只认准一个人，可以向实验室管理菌种保存的人询问，而且他是首选的人选。
- **其他的研究人员**。如果在文献中看到有你需要的菌株，写信或发电子邮件向作者索要，如果两个星期内没有回音，就再打个电话询问。但是不要索求那些已经商业化的菌株，从文献的材料和方法中可以找到来源。
- **ATCC（美国模式培养物保藏所）**。ATCC是非赢利性的组织，他们保存和提供菌株、病毒、DNA探针、植物细胞和动物细胞。那里的菌株资源量很大，而且每株细菌都会得到定性，只用很少的钱就能得到你想要的。
- **其他的收集和服务组织**。有许多组织收集和保存特殊的菌株，而且NIH（全国卫生研究所）还资助一些实验室保存和提供一些特殊的菌株，这些菌株可以通过文献查到或口头听说，如果你没有时间去做这些，试着联系ATCC或CDC或在互联网上搜索。
- **公司**。这是获得基因操作和蛋白质表达所用噬菌体和细菌的主要来源。在购买前，仔细阅读公司提供的资料。

CDC(疾病控制和防治中心)控制对于公众健康可能是潜在危害的生物制剂，他们制订了获取、运输、储存、转移微生物、病毒和毒物的规则。参照单位和CDC的规则获得和发送生物制剂，处罚违反规定的单位和个人。

每得到新的菌株（包括从公司得到的）都要确认它的确是你所需要的那种，不要根据包装或价格来认定。为避免有错，挑细菌的单菌落进行酶解或是其他功能实验来确认菌株的正确。

细菌的改变。随着时间的变化和不断的培养，细菌的某些特征可能会被自然选择，菌株可能会发生表型和基因型上的变化，为了避免这种情况的发生，尽量减少传代的次数。

表型漂变通常只是对那些外来种（对某些实验室来说，就是除大肠杆菌和沙门氏菌以外的菌株），但是那些用来高表达蛋白质的大肠杆菌菌株，由于不断的传代也可能会发生漂变，从而产生功能上的变化。

培养和维护

只有需要时才培养菌体，以防止突变和污染。

细菌的培养有多种方法，要根据不同细菌的不同要求来决定（好氧的或厌氧的、摇瓶培养或固定培养），或根据你的方便进行培养（液体培养基或半固体培养基）。

液体培养可以使细菌的数量达到最大，而且容易收获菌体。

半固体培养是液体培养基中加入作为固化剂的琼脂，使得培养基成胶体状，然后可以分装倒入不同规格的培养皿中使用。细菌可以混合到培养基中也可以在培养基表面生长。由于半固体培养基的每个菌落都是由一个细菌分裂得到的，所以平板培养可以用来分离和筛选特定的菌落。

你必须知道你所培养的微生物的生理知识，以便更好地培养它。比如，大肠杆菌是兼性需氧微生物，可以在有氧和微氧情况下生长，有氧情况下使用氧气作为最终的氧化剂，微氧下利用发酵来得到能量，但是在有氧条件下生长得更好更快。这就是为什么培养时要摇动三角瓶，而且要留出一定的空间来进行气体交换的原因。

细菌在液体培养基中的生长方式是十分独特的，可以分成如图 11-1 所示的几个阶段，当细菌刚刚接入液体培养基时，它们并不生长。在这个**滞后期**，细菌的生物量少许增长，以适应新的环境并合成所需的成分。

接着细菌的生长进入**指数生长期**，或称**对数生长期**，因为这时的细菌数量成指数增长。

当化学和物理环境变化时，细菌就得到信号进入**稳定期**。这时的细菌数量不再增长，它只是需要能量来维持生命。当能源用尽的时候，细菌进入了**死亡期**，细胞数量开始不断减少。

不同的应用需要细菌处于一个特别的生长时期，通常是指数期的后期和稳定期。忽略了生长周期的重要性将会对实验的成功起到很不好的影响。细菌生长的状态可以从培养基的浑浊程度上判断。

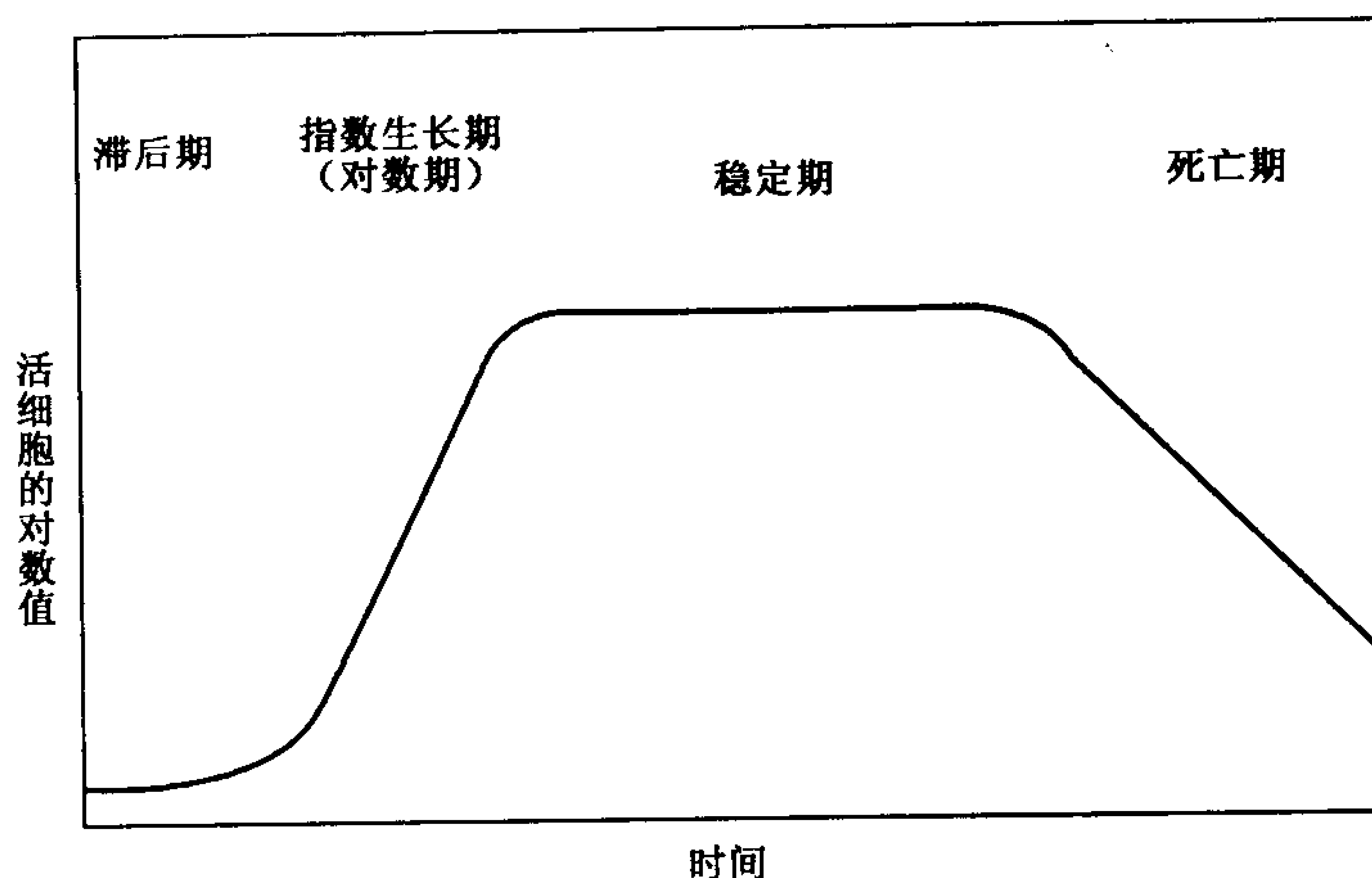


图 11-1　大肠杆菌在液体培养基中的正常生长曲线

在开始实验前必须计算好细菌生长的周期和收获的时间。

配制试管或瓶装液体培养基

大肠杆菌所需要的培养基，对于公司是很容易配置的，对于一些配方，你只需要称出1～3种成分，灭菌和分装。

材料

- 配制 500 ml 培养基所用的药品
- 37℃ 的水浴锅
- 移液器
- 移液头
- 本生灯（只有当你使用玻璃的移液管和试管时会用到）

步骤

1. 配置培养基，不要混合那些热不稳定的药品，如抗生素、生长因子和维生素。如果需要，还要调节 pH 值。
2. 高压灭菌 20 min。
3. 从灭菌锅拿出后放在水浴中 30 min，也可以放在实验台或暖房内降温。
4. 对热不稳定的药品进行过滤除菌，使用无菌操作技术把它们加入到灭好菌的培养基中，摇匀。
5. 将三角瓶放置在你的左手边，使用无菌操作技术（见第 9 章）把培养基分装到试管中。工作中使用火焰帮助保持移液管和试管口的无菌状态。
6. 在试管上标好培养基类型、配制人和配制时间，并

> 如果可能，配制培养基的过程在通风橱内进行。

> 如果担心在分装培养基时发生污染，那么在 37℃ 培养过夜，看看有没有东西长出。

记下抗生素的类型。

7. 将分装有培养基的试管保存在4℃，培养基没有加入抗生素和其他的对热不稳定的物质前可以存放几个月，有抗生素的培养基要在几周内用掉。

配制平板固体培养基（倒平板）

许多实验室有专门的人员制作和包装平板，即使你很幸运也碰到这种情况，但也要学会自己倒平板。

平板内可能要倒15～20 ml的含1.5%琼脂的培养基，如果倒的太薄，很容易在培养箱内干掉。带抗生素的培养基平板必须在1～2星期内用掉。

> 不要用100 mm的细胞组织培养板代替细菌培养板，虽然不会有什么问题，但是比较贵。

材料（适用于25～30个90 mm的平板）

- 一个1000 ml的三角烧瓶
- 可配制500 ml培养基的药品
- 7.5 g的琼脂，细菌培养用琼脂（Difco）是最合适的，不要使用琼脂糖
- 无菌的平板，一次性塑料平板中90 mm是最常见的型号
- 45～50℃的水浴，刚开始倒平板时可以设置到50℃，如果你的动作够快，可以开始时就设置到45℃，不必担心在倒完前琼脂会凝固
- 本生灯

步骤

1. 配置培养基，不要混合那些热不稳定性药品，如抗生素、生长因子和维生素。如果需要，调节pH值。

> 有些实验室用号码和颜色来区分不同的培养基。

2. 高压灭菌20 min。
3. 从灭菌锅拿出来后放在水浴中30 min。
4. 当培养基冷却到适当温度时开始倒平板。把平板从包装中拿出来，因为平板在培养箱中要倒置，所以在平板底面上标好培养基和抗生素的类型，把平板叠放在你工作区的左手边。

> 即使你带着手套能够拿住高于50℃的培养基，也要等低于50℃时才倒平板，以免它在平皿中发生过渡收缩。

5. 准备好过滤除菌的热不稳定性药品，加入培养基内。如果这些药品的体积较大，为保证加入后不会影响培养基的温度，保持它们是室温的。
6. 如果烧瓶是在50℃的水浴中，那么操作时要戴隔热手套，如果是45℃的水浴，可徒手或只戴乳胶手套即可。

> 不要让培养基流到瓶外，因为它可能会产生污染，把滴出的液体擦掉。

7. 无菌操作把抗生素和其他热不稳定的药品加入灭好菌的培养基中。
8. 将烧瓶的盖子拿下，放在一边，立即由右手拿好烧瓶并将瓶口接近火焰，用左手打开平皿。

9. 倒大约 15 ml 培养基到平皿中，直到距上盖几厘米处，烧一下三角瓶口，并保持三角瓶 45°。

10. 盖好平皿，将新倒的平板垒在先前的平板上，小心不要溅出来。

11. 打开另一个平皿，烧一下瓶口，倒平板，间或晃动一下三角瓶以保证液体的连续性。

12. 继续倒平板，如果培养基已经开始凝固就不要倒了。

13. 在平皿堆的最上面放一个装有热水的三角瓶或试剂瓶，以减少培养基的收缩，静置 20～60 min。

14. 将还在收缩的平皿放到培养箱中，或在一个通风橱内放置几小时，在橱内可以使盖子微开。

15. 把倒好的平板包好，做好标记并在冰箱内存放。

> 平板的表面一定要平整，如果产生了气泡那么赶快用喷灯加热表面赶走气泡，小心不要把塑料平皿烤糊。

> 如果抗生素是光敏性的，用锡箔纸把它们包好或放入盒内。四环素就是光敏性的。

☆ **配制试管固体培养基（倒斜面）**。倒斜面是在试管内倒入固体培养基，它之所以被称作斜面，是因为使含有琼脂的培养基在试管倾斜的情况下凝固，形成一个平整有夹角的表面用来划线。这些试管同样可以用来进行固定培养，可以用接种针刺入培养基，使细菌在培养基内生长。

基本过程和倒平板一样，只是用仪液管把培养基加入试管至 1/2～1/3 处，并把试管放置在斜面上，将盖子拧松以防收缩。

所有尺寸的试管都可以使用，大多数实验室使用最小的玻璃管进行闪烁计数，因为它既便宜又容易储存和运输。

复苏培养

你可能会经常接触到细菌的复苏，比如你从别人那里索要到菌株，可能收到的是一个冻存管或是一个斜面或平板，或一个固体培养物。ATCC 邮寄冻干甚至生长中的培养物。

复苏冻干菌的步骤

1. 用 70％的乙醇清洁管子的外部。

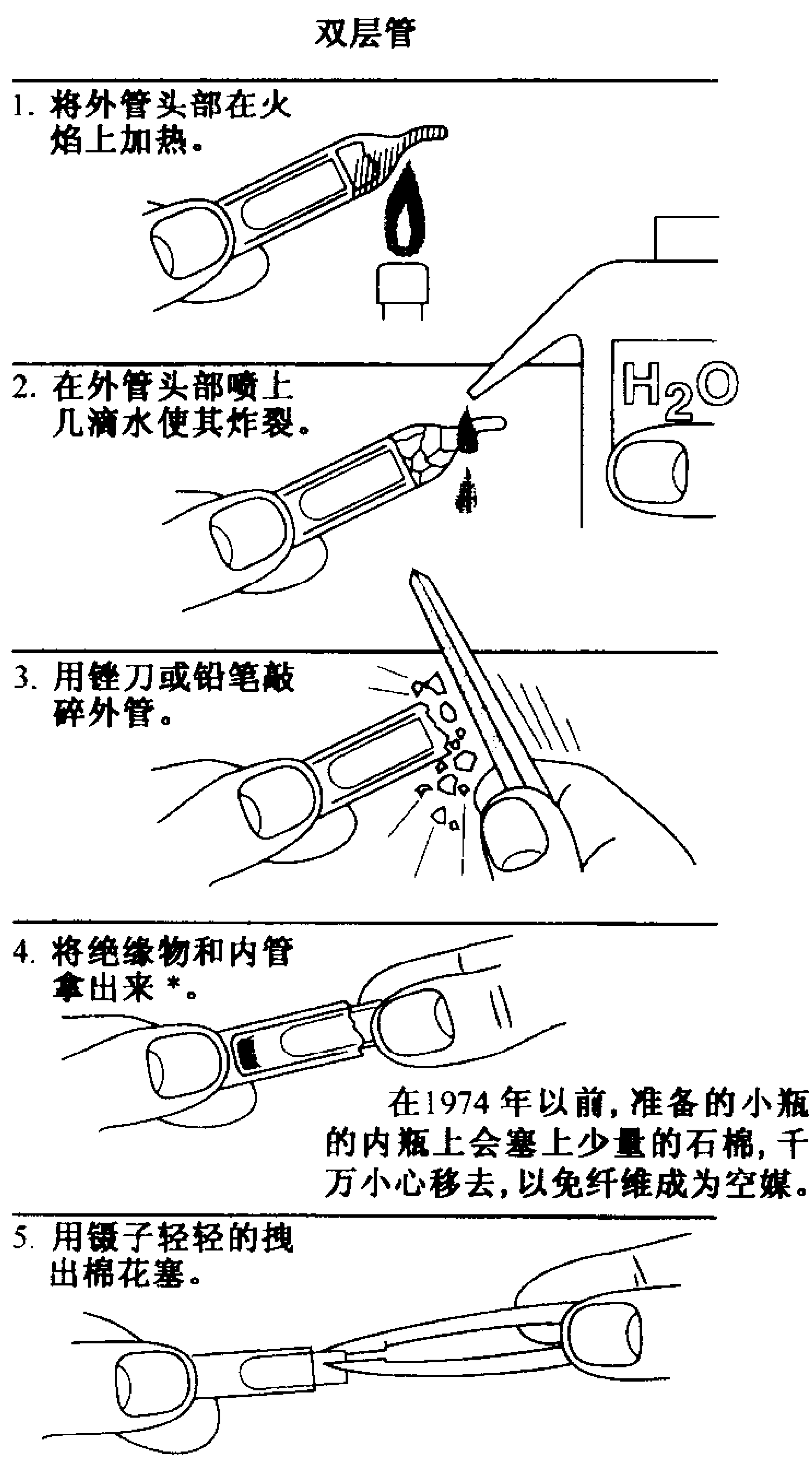
2. 加入 0.4 ml 的无菌培养基（预热的）至管中。

3. 用吸管小心吹打，直到菌体完全悬浮。

4. 将悬浮液加到含 5 ml 培养基（预热的）的试管中，留下 10 μl。

5. 将剩下的 10 μl 菌液划线培养。

6. 在合适条件下培养试管、平板或斜面。



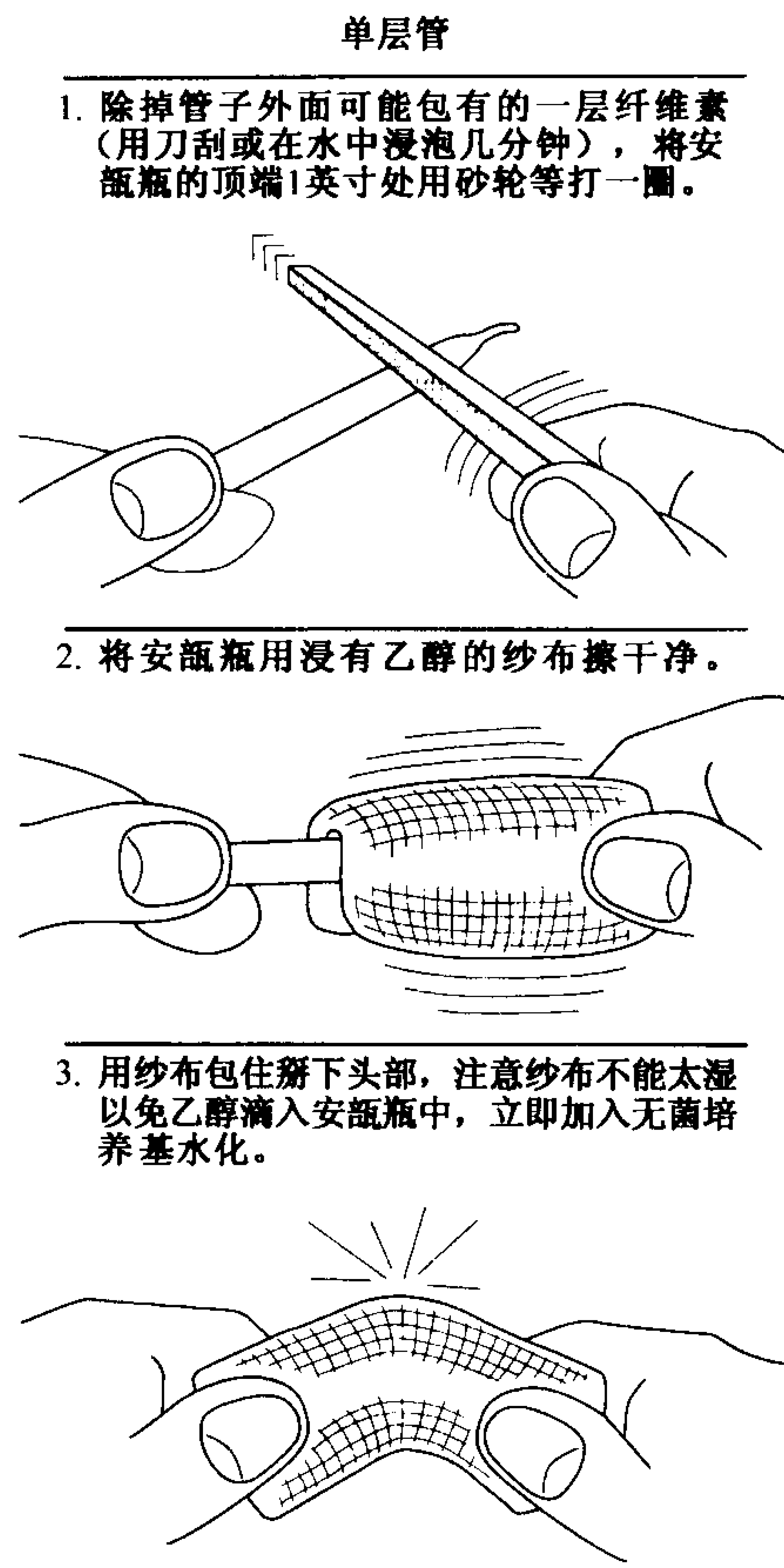


图 11-2 怎样打开冻干培养物的瓶子

复苏冻存菌株的步骤

大多数冻存的细菌（如绝大多数大肠杆菌）不需要完全融解就可进行重培养。

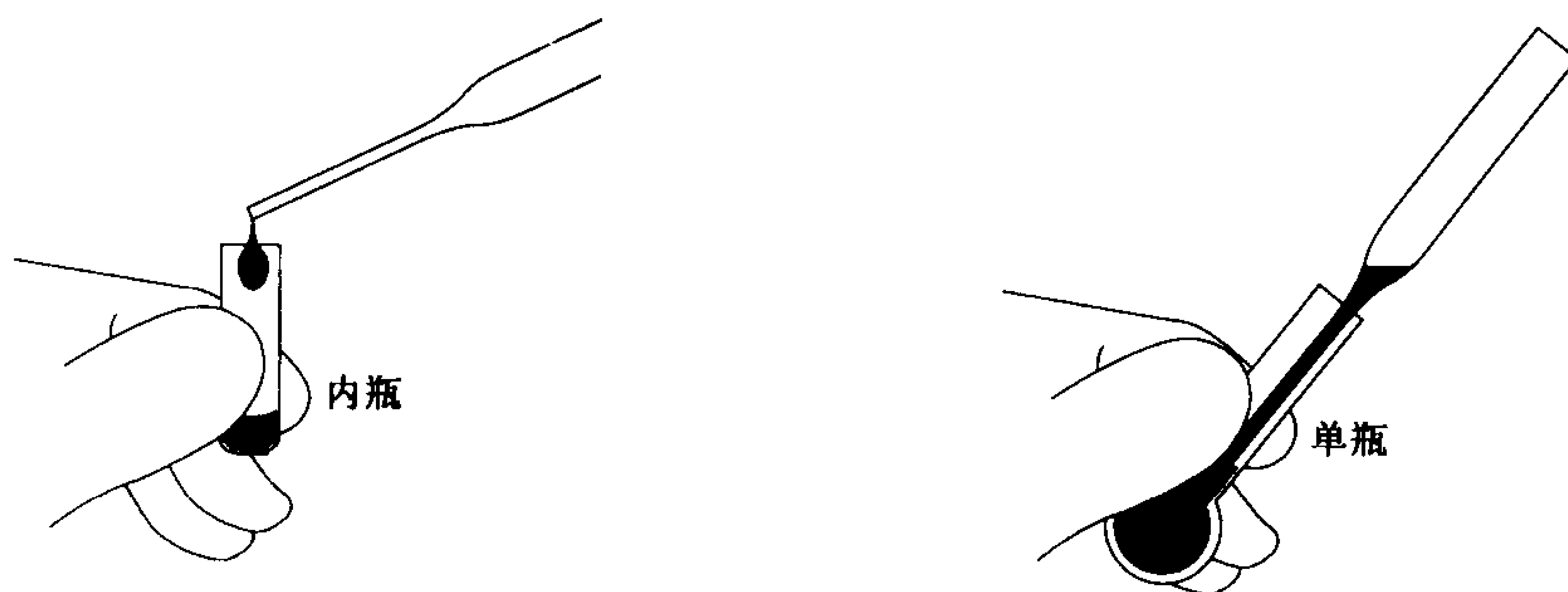


图 11-3 使用无菌的巴斯德管水化、悬浮、转移细菌培养物到培养基或平板

巴氏管必须用棉花塞住，并作为有生物危害的锋利废物丢弃。

1. 把冻存管从冰箱或干冰中拿出后立即放到实验台或通风橱内。
2. 用火焰灼烧接种环（或直接使用无菌的一次性接种环），冷却几秒钟后，接触冻存培养基的顶部。
3. 把培养物放回冰上。
4. 在平板或斜面上划线。
5. 立即把冻存管放回冰箱，至少－70℃。
6. 在适当的条件下培养平板或斜面。

冻存菌体复苏时可能会有一个比较长的延迟期，需要比较长的培养时间。

不要反复冻融细菌培养物。

复苏复杂营养细菌培养物的步骤

生长比较缓慢或营养要求比较高的细菌开始培养时需要比较大的接种量，而有时比较老的大肠杆菌也要通过这种方法复苏。

1. 把冻存管从冰箱或干冰中拿出。
2. 37℃水浴融解菌体。
3. 使用巴氏管转移大约1/2体积的菌液至4 ml新鲜培养基中，把剩下的菌液放到冰上。
4. 在适当的条件下培养。
5. 立即把冻存管放回冰箱，至少－70℃。

对于转化了有抗性质粒的菌株要生长在加入了相应的抗生素的培养基内，但是在进行抗性筛选前带有 Tet^r、Amp^r、Kan^r、Cam^r 等抗性的菌株要先在不含抗生素的培养基上生长以使抗性蛋白的表达。

抗 生 素

- 遗传工程的质粒常常带有至少一种抗性基因，这样使得不论实验人员要表达哪种蛋白质，质粒都可以被筛选。只有那些带有表达质粒的细菌可以在有抗生素的培养基上生长。
- 所有常用质粒都含有一种或多种抗氨苄青霉素、四环素、氯霉素或卡那霉素的基因。
- 抗生素都是热敏感的，所以在培养基灭菌和冷缺后再加入。抗生素也可以分装后冻存。
- 有些特殊的抗生素是不常用的，所以购买时选择那种不用称量后分装的小包装，例如100 mg，虽然可能比购买大包装的要贵，但是总比用不完过期扔掉便宜。
- 抗生素的作用浓度有一个范围，不同目的要使用不同的浓度，参考那些和你使用相同菌株并进行类似实验的人所用的浓度。

表 11-1　筛选携带抗性质粒菌株时常用的抗生素

1．四环素（储备液浓度 15 mg/mL）

称取 15 mg 四环素，溶解在 0.5 ml 无菌水和 0.5 ml 乙醇中（通风橱内操作），将储存的管子用锡箔纸包好。将 1 ml 储存液直接加入预冷的 1L 含琼脂的培养基中（工作浓度 15 μg/mL）

2．链霉素（储备液浓度 100 mg/mL）

配制比所需体积稍多的储存液，因为在过滤除菌中可能会有损失。称取 200 mg 链霉素溶解在 2 ml 水中，过滤除菌。将 1 ml 储备液直接加入预冷的 1 L 含琼脂的培养基中（工作浓度 100 μg/mL）

3．卡那霉素（储备液浓度 30 mg/mL 或 50 mg/mL）

根据平板大小配制 30 mg/mL 或 50 mg/mL 的储备液。配制比所需体积稍多的储备液，因过滤除菌可能会有损失。称取 60 mg 或 100 mg 卡那霉素溶解在 2 ml 水中，过滤除菌。将 1 ml 储备液直接加入预冷的 1 L 含琼脂的培养基中（工作浓度 100 μg/mL）

4．氨苄青霉素（储备液浓度 100 mg/mL）

配制比所需体积稍多的储存液，过滤除菌时可能会有损失。称取 100 mg 氨苄青霉素溶解在 1 ml 水中，过滤除菌。将 1 ml 储备液直接加入预冷的 1 L 含琼脂的培养基中（工作浓度 100 μg/mL）

5．氯霉素（储备液浓度 20 mg/mL）

称取 20 mg 氯霉素溶解在 1 ml 乙醇内（在通风橱中操作）。将 1ml 储备液直接加入预冷的 1 L 含琼脂的培养基中（工作浓度 20 μg/mL）

6．利福霉素（储备液浓度 50 mg/mL）

称取 100 mg 利福霉素溶解在 2 ml 甲醇内（在通风橱中操作），立即振荡以免药品贴在试管底部，滴加 5 滴 10 N 的 NaOH 帮助溶解。将 2 ml 储备液直接加入预冷的 1 L 含琼脂的培养基中（工作浓度 100 μg/mL）

利福霉素对光敏感，平板必须保存在黑暗的条件下或用锡箔纸包好，也可通过添加 minimal A salt（每升培养基添加 100 ml 10 倍的 minimal A salt）来延长平板的寿命。

7．萘啶酸（储备液浓度 100 mg/mL）

称取 100 mg 溶解在 1 N NaOH 中，将 0.3 ml 储备液直接加入预冷的 1 L 含琼脂的培养基中（工作浓度 30 μg/mL）

8．甲氧苄氨嘧啶

使用时，在无菌的情况下称取 10 mg 药品，直接把粉末加入预冷的 1 L 含琼脂的培养基中（工作浓度 10 μg/mL）

表中所列的浓度为标准浓度，但有些菌株可能需要的浓度不同；表中所用水为灭菌的蒸馏水。抗生素分装后保存在 -20℃。

获得分离的克隆

学习通过划线培养获得单菌落是**十分重要**的，一个菌落就是半固体培养基平板上的小岛，是**单个细菌产生的克隆**。除非是从一个菌落开始培养，通常得到的是混合物或带有污染的培养物。必须学会从培养物中挑选单菌落，否则将永远不能确定分离操作是你所要的东西。

在琼脂平板上用接种环划线：单菌落

分离菌落前要先稀释菌体以致挑取单菌落时不会接触到其他的菌落。

> 划线培养是把单一菌落从混合物中分离出来或进行鉴定的不可缺少的方法。

材料

- 一个金属的接种环（通常是白金的），一次性的接种环也可以，虽然价格贵但是实用，特别是对于 BL3 级有机体
- 本生灯或无火焰的接种环加热器
- 平板
- 生长在肉汤或半固体培养基内的菌体

安排好所有用品，以减少活动造成污染的可能性。
- 使用右手的人将本生灯放在左边。
- 平板放在左手。
- 菌体放在中间。
- 松开试管和三角瓶的盖子。

步骤

1. 在平板底面上标好你的名字、日期和菌株。将平板分成四区，可以按顺时针标上 1、2、3 和 4。
2. 加热接种环，如果你使用的是本生灯，从距顶端6英寸处加热，这样可以除去附着在接种环上的细菌。如果你使用的是无火焰的接种环加热器，按说明书加热到需要的温度。
3. 左手拿试管，振荡悬浮菌体，用右手的最后两个手指打开试管盖子，将试管口在火焰上烧一下。
4. 插入接种环（已经冷却），不要接触试管壁，插入液体表面即可。
5. 再一次将试管口在火焰上烧一下，盖好盖子放回试管架。动作要快，但是不要舞动接种环。
6. 左手拿平板，用最后的三个指头托住底面，用大拇指和食指微微掀起盖子。
7. 在第一区靠近边缘的地方把接种环接触到培养基表面，不要把接种环插到培养基里面。在这一区内有节奏的前后移动接种环，直到运动到中央，不要跨线。
8. 盖好平板的盖子，从前到后再次灼烧接种环 5～10s。
9. 90°旋转平板，打开盖子，接触到第一区中间线末端处。从上一条线处划过并进入空区，再在这一区内继续划线，注意不要过线。
10. 在空白区域内重复步骤 7、8、9 操作两次。
11. 再次灼烧接种环，把它放好。
12. 在适当温度下，倒置培养平板培养。

培养时平板要倒置，以防冷凝水滴到菌落上。

灼烧不仅可以杀死表面的细菌，还由于热空气的对流防止悬浮的细菌掉落在接种环或试管中。

如果你的菌体是在平板上，注意要挑起单菌落，而且只要接触到表面就好，不要把整个菌落挑起来。

接种环不能过热，可以在不划线的地方待其冷却，注意划线时不要划过这些高低不平的地方。

在一块平板上划线培养多个样品

如果从一个菌落开始接种，在一块平板上划多个样品可以节省时间和试剂。这种方法在克隆实验中也是常见的。进行这种操作时，你必须已经是一个划线的老手了，因为

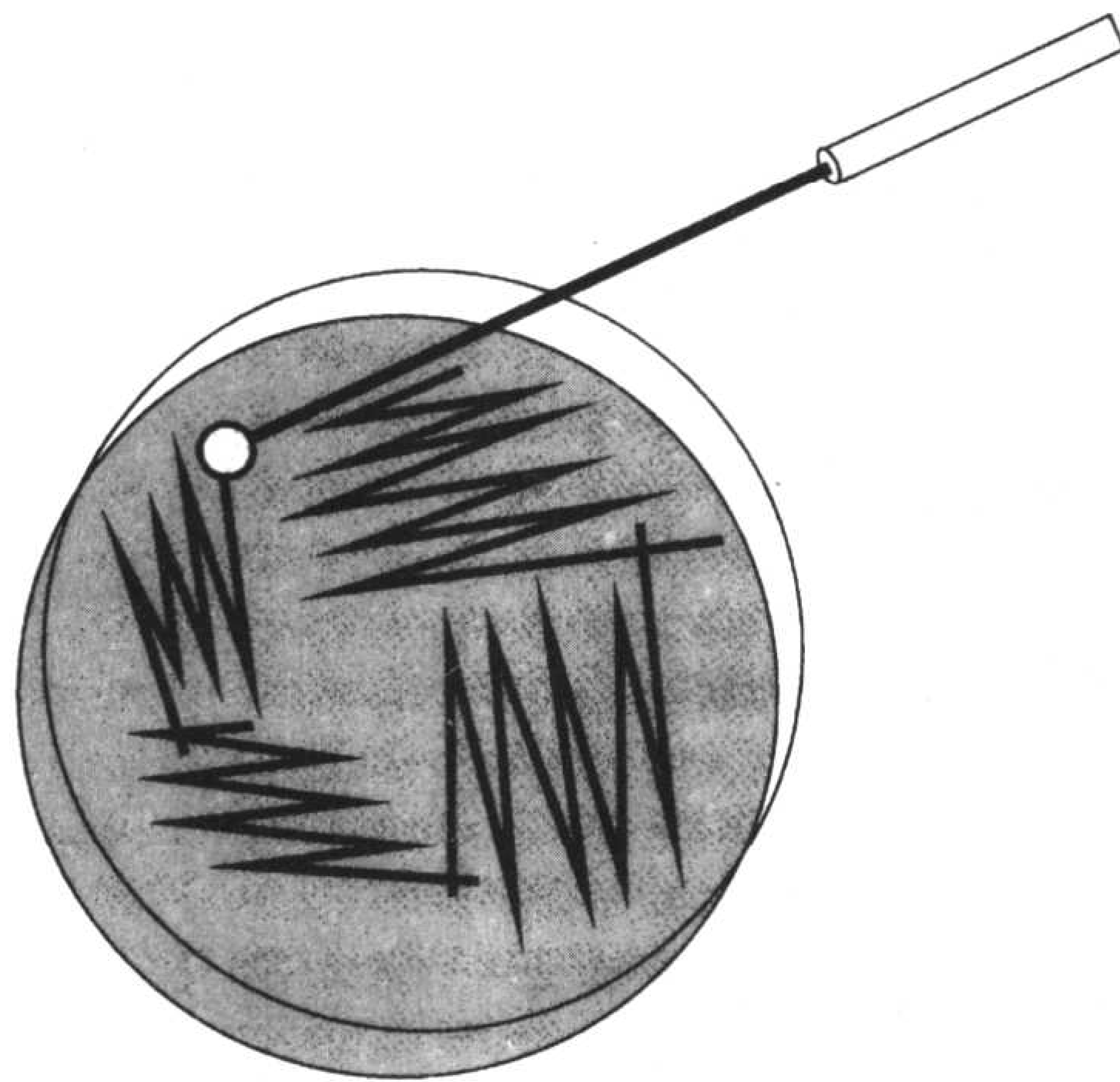


图 11-4 如果把平板倾斜成合适的角度，可以观察到已经划出的线

从生长有多个样品的平板上挑取单菌落是很难的。

材料

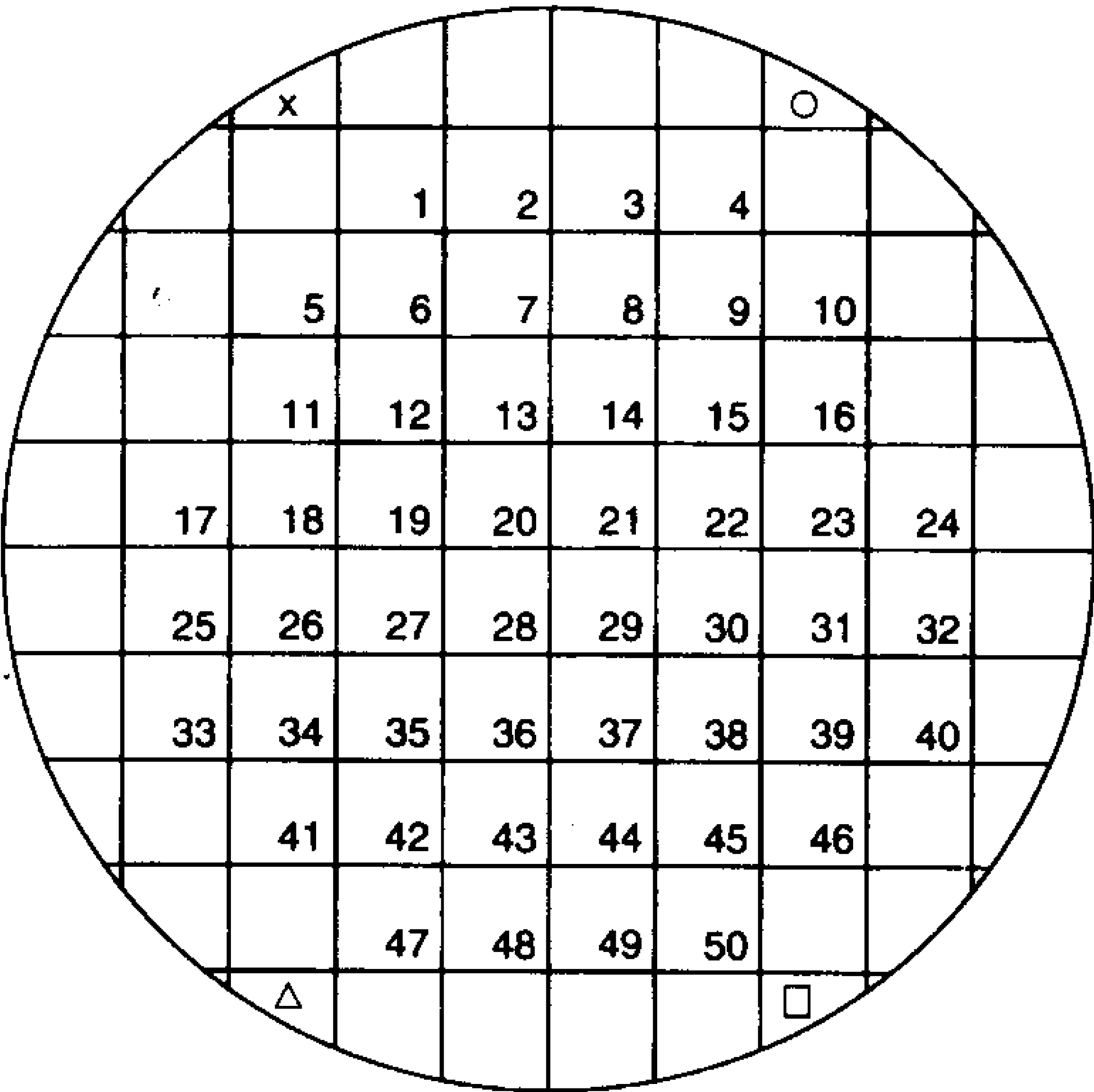
- 一个金属的接种环（通常是白金的），一次性的接种环也可以，虽然价格贵但是实用，特别是对于 BL3 级生物体
- 本生灯或无火焰的接种环加热器
- 平板
- 生长在肉汤或半固体培养基内的菌体

步骤

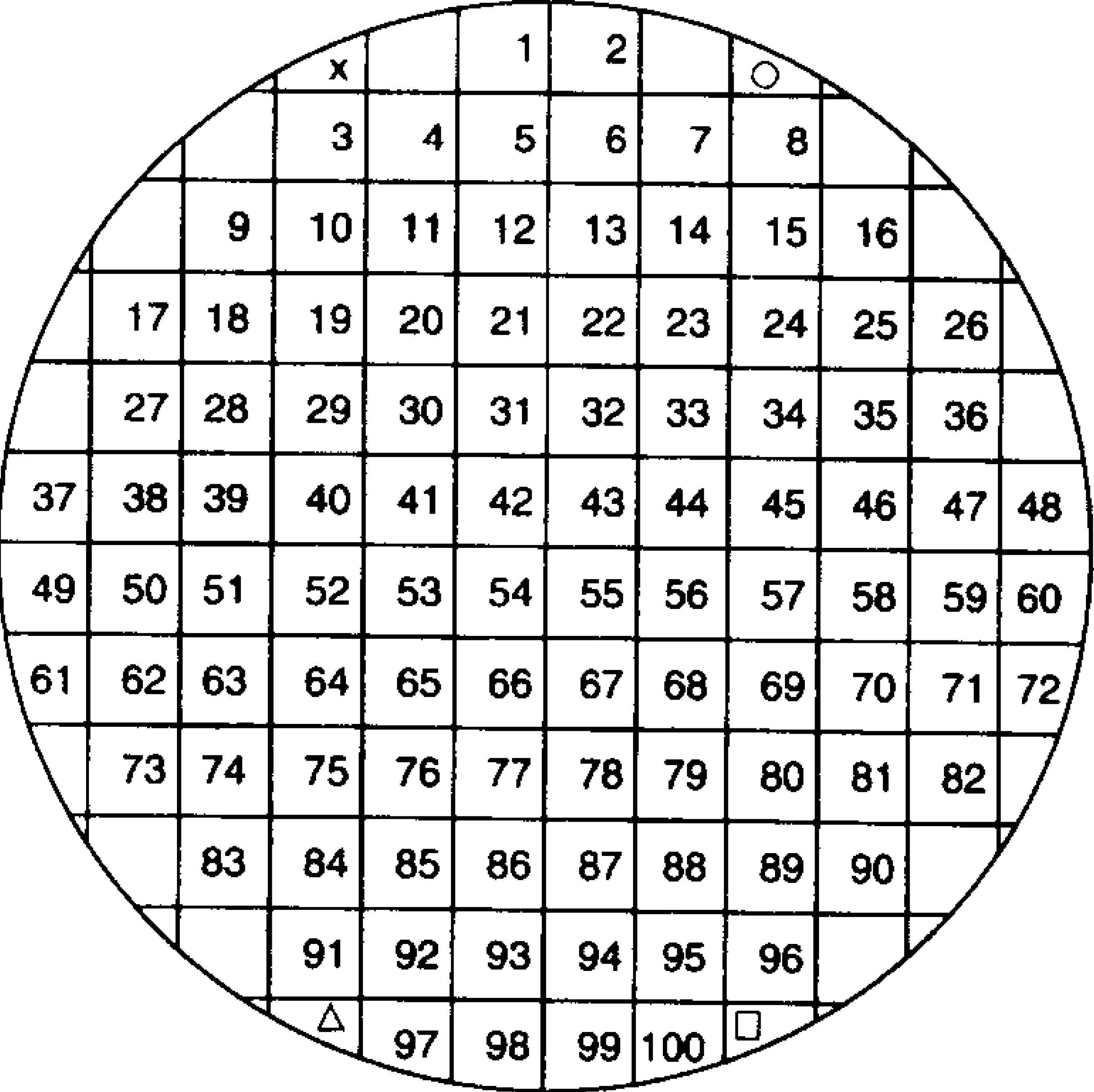
1. 在平板底面上标好你的名字、日期和菌株。
2. 轻轻的在平板底部做标记，把它分成 6 或 8 个区，并在每个区内标明样品的名字和编号。
3. 使用烧过并已经冷却的接种环挑起单菌落。如果是肉汤培养基，不要把整个接种环浸在培养基内，而只要轻轻地接触一下表面即可。
4. 从边缘开始慢慢地向中间滑动，不要过界，也不要接触其他的线。
5. 每个样品划两次，每次都要灼烧接种环。
6. 在适当的温度下倒置培养。

斜面和穿刺培养

只能使用单菌落接种。对于斜面从试管底部开始向上划线，对于穿刺培养使用接种针穿过培养基表面。通常一个斜面既可进行划线培养又可进行穿刺培养。



50 个克隆的平板



100 个克隆的平板

图 11-5 在进行多个样品的划线时，一定要注意少沾取原液，以便能够得到单菌落

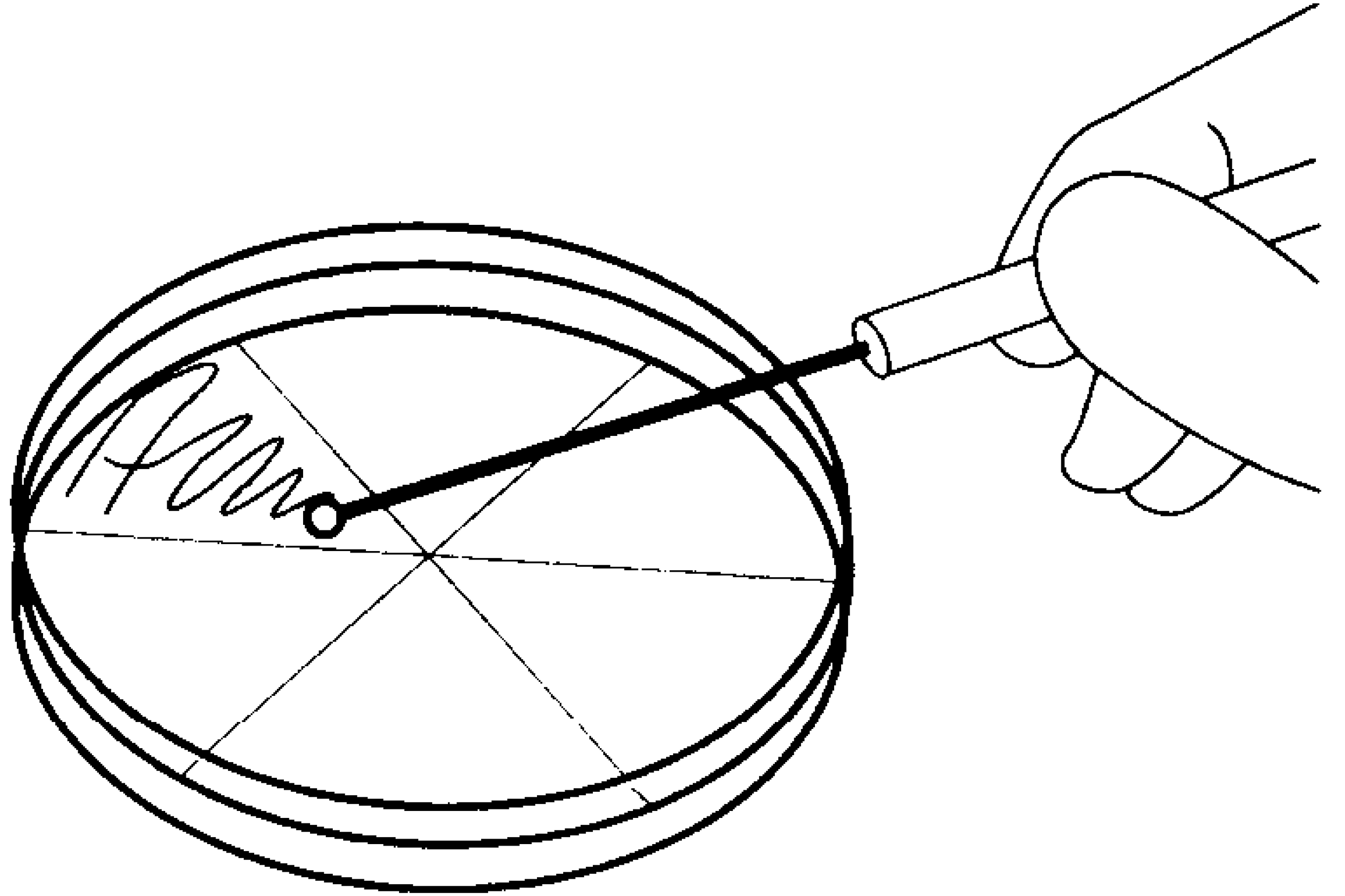


图 11-6 对多个样品划线时，尽可能少地接取种菌以保证得到的是单个克隆

使用牙签挑取克隆

在你有许多分离得很好的克隆时可以使用这种方法，你可以使用一个接种针（与接种环类似，但针头更钝），但它会更为乏味。

材料

- 平板或半固体培养基。
- 样板，用一个纸板代表一个被分成30～100份的平板。
- 细菌样品，半固体培养基上的菌落，如果想对挑出的菌落进行鉴定，那么事先将其编号。
- 小烧杯装牙签，干热灭菌，上面用铝箔封好。
- 用来丢弃牙签的容器。

当然可以用染色的方法来区分出活的和死的细胞。

步骤

1. 在平板顶部标注（因为底部没有地方）姓名、日期和菌株，用方向箭头在底部确定每一个克隆数目是哪一排的。以便和样板上的记号相对应。
2. 把平板放在样板上，并对应好。
3. 用灭菌的牙签轻点菌落，然后再把它轻轻点到平板的相应位置。
4. 丢弃牙签，对所有目的克隆重复上述操作。

细 菌 计 数

有两种主要的方法可用于细菌计数：利用计数计进行显微计数，如 Petroff Hausser 计数计（细菌也可以用 Coulter 计数计），或**活菌平板计数**。

使用**计数计计数**适用于需要立即得知培养基中细菌数量的情况。例如，使用细菌感染前你想知道培养基中细菌的数量，这时，你只需要取出一些样品，滴在计数板上，在显微镜下进行计数。当然这时你数出细菌总数包括活的和死的细菌。

多数研究人员把**活菌平板计数**当作标准的操作，用来制作生长曲线、测定效价或判断不同生长条件下细菌的存活量。把稀释过的培养基铺在平板上使它生长，记录能生长的细菌数，成团的只能算作一个。

当然也可以不用计数，从培养基的浑浊程度来判断菌体是否发生了增长。这是最简单和最快速的判断菌体生长的方法，这种方法只有当已经知道了某个状态菌液的吸光值和数量时，才能推断出细胞数量。

有现成的染色方法可以区分死的和活的细菌。

使用 Petroff Hausser 计数计

材料

- Petroff Hausser 或其他的细菌计数计如 Helber，不要使用血球计数计
- 特制的可回收的盖玻片
- 移液器和移液头
- 稀释用的培养基
- 微量离心管
- 计数器
- 光学显微镜，直立的或倒置的

步骤

1. 用 1 ml 或 2 ml 的移液管无菌移取 0.5 ml 的菌液至微量离心管中，如果菌液量较少，就减少移取的体积，最好使用移液管而不要使用移液器。
2. 取出计数计，用水和 70%的乙醇将其清洗干净，用吸水纸吸干，将盖玻片放上，保

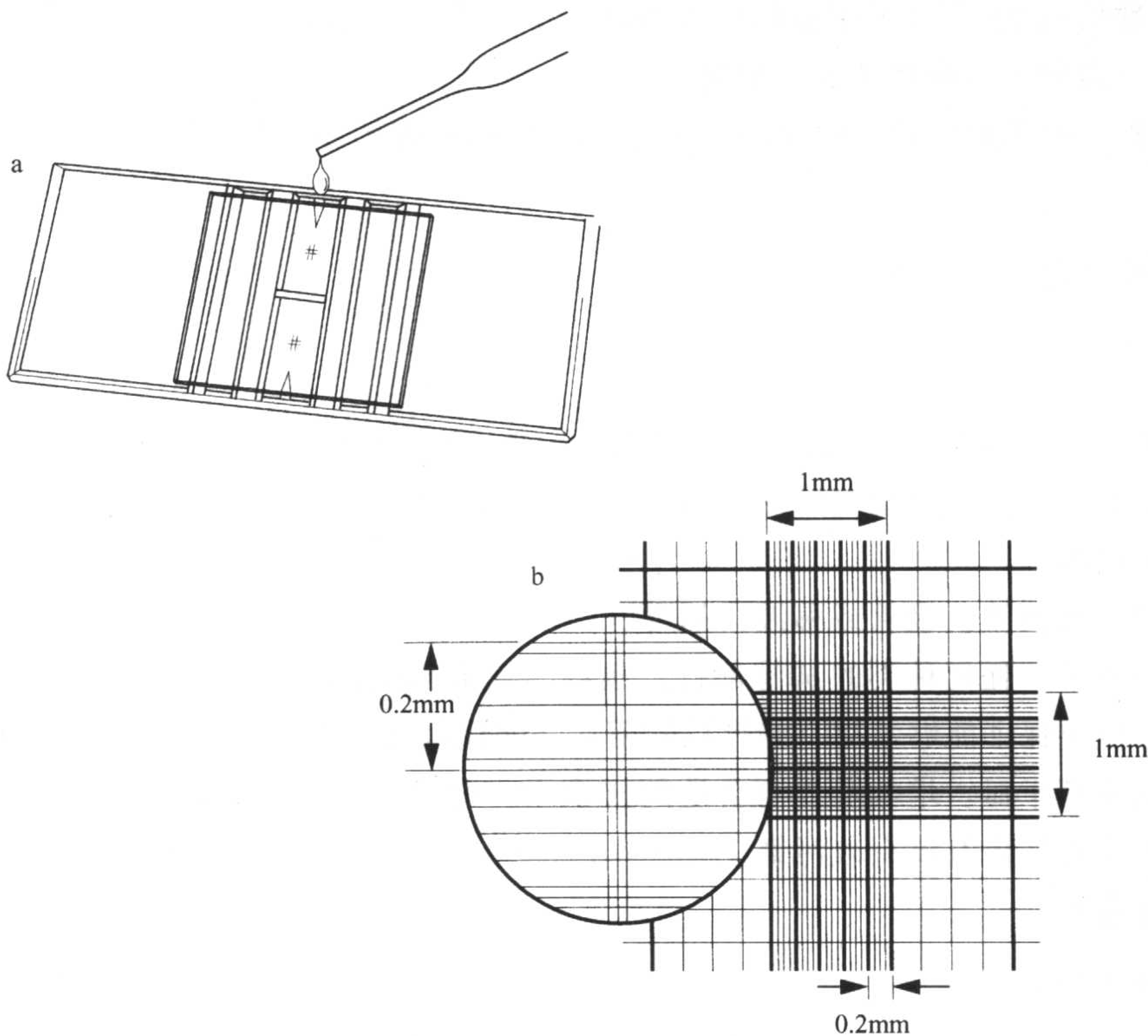


图 11-7　Petroff Hausser 计数计

a. 加入一滴细菌悬浮液，通过毛细作用将菌液吸入计数室；b. 在高倍镜下观察计数板的格子。每个标尺之间的间距为0.02 mm，所以每个小格的面积为0.02 mm^2。

证计数室处在盖玻片的中央。

3. 将 50 μl 菌液加入计数室。取样前将菌体摇匀，吸出 50 μl，不要直接打下。缓慢按下移液器的按钮，使液体滴出，但不要滴下，让这一滴液体留在嘴尖，把这一滴液体接触盖玻片的一边，由于毛细现象液体会被吸入。注意不要使液体溢出计数室，如果液体溢出到沟槽内，那么把板吸干重新来过。
4. 静置 5 min。
5. 把计数板放在载物台上，用 10× 物镜找到计数室后，换到 40× 物镜。
6. 大体数一下以决定是否需要稀释，在 25 个小方块内应有 100～500 个菌体。如果太多，计数会不准确。稀释 5 或 10 倍后，计数时会省下很多时间。
7. 计数。最少要计数 25 个方格内的菌体数（包括压线的），将数出的总数除以方格数，重复 3 次取平均值。
8. 计算。将平均每格内的细胞数乘以 2×10^7，如果进行稀释了，再乘上稀释倍数，得到的是原始菌液的细胞数/ml。

例如：

将原始样品加入计数室内，粗略估计为 90 个/格，所以稀释 10 倍，取 100 μl 样品加入 900 μl 培养基。

计数后每 25 个格子中菌体数为 200、171 和 192。也就是 563 个菌体，除以 75 个格子，得到平均每格 7.5 个细菌。

7.5×10(稀释倍数)$\times2\times10^7=1.5\times10^9$个/ml(原始菌液的浓度)

活菌平板计数

材料

- 稀释液。使用培养基或 0.1% 的蛋白胨水溶液，注意稀释液已经灭菌并在使用前已放置在室温（过冷会阻止细菌的繁殖）。如果确信对你的微生物没有害处，可以使用盐水或蒸馏水。
- 移液管。移液管、吸管或移液头都可以。
- 无菌的管子。任何种类的试管都行，塑料的或玻璃的，越便宜越好，只要干净而且无菌，但要保证能够装得下稀释后的菌液并能让吸管插进去。
- 固体培养基平皿。培养基要有合适的抗生素，而且在使用前要恢复到室温，注意使用前要检查平板有没有被污染。
- 涡旋振荡器。
- 肉汤细菌培养基。
- 本生灯。
- 旋转台。
- 玻璃涂布棒，可以自己用玻璃棒做，也可以大包装购买。

为了节省，可以用长的巴氏管自己制作涂布棒。把玻璃管在火焰上加热，用镊子把它弯成需要的形状。

- 100～200 ml 70% 乙醇，装在 500 ml 的烧杯内。
- 菌落计数器。

步骤

制作稀释液（见第 7 章）

1. 准备好稀释用的试管，最常用的是 10 倍稀释。900 μl 的培养基逐个进行稀释、混合和移液。如果不清楚细菌生长的特点可以多准备8～10个平板。
2. 取 100 μl 菌液至 1 号稀释管中（10^{-1}稀释），弃掉移液管，将试管贴在振荡器上混匀。
3. 从 1 号管中取 100 μl 液体至 2 号稀释管（10^{-2}稀释），弃掉移液管，把试管贴在振荡器上混匀。依次转移 100 μl 至一系列的稀释管中。

> 在移液和加样时，玻璃试管要接近火源。

> 如果你的速度够快，可以使用同一个移液管，按浓度从低到高把菌液吸到平板内，这样的话你就必须多准备几个涂布棒，因为它不能很快的冷却下来，让你安全的放入乙醇内。

涂布平板

1. 在平板上标明稀释度、姓名、日期和样品名，最好能再做一个相同的备用板。
2. 从最后稀释度的试管中取出 100 μl，慢慢滴入对应的平板内，弃掉移液管。
3. 将平板放到旋转台或实验台上。
4. 将涂布棒在酒精内浸一下，酒精必须覆盖头部和把手底部的 1 英寸处。
5. 将涂布棒在火上灼烧，火焰应该把涂布棒的前端全部烧遍，但是要把棒上的火焰立刻弄灭。
6. 将涂布棒放在培养基上直到冷却，注意不要接触到菌液。

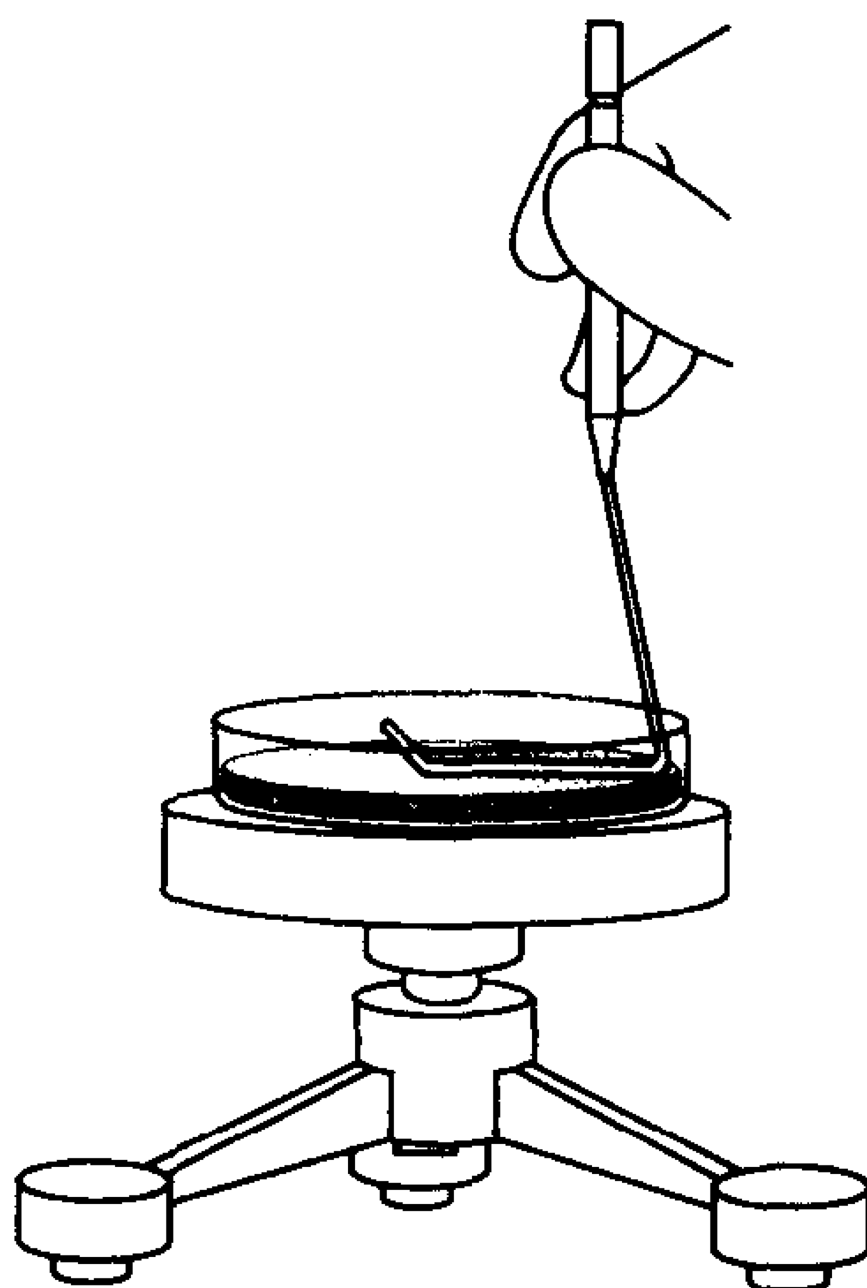


图 11-8 使用旋转台涂布菌液

7. 前后刮动涂布棒，争取把液体覆盖到整个平板上。如果有旋转台，把涂布棒固定，旋转台面进行涂布。
8. 待平板静置 5 分钟后再倒置放入培养箱，当菌落都能看清时，立即从培养箱中取出，不要让菌落生长的过大。

计数菌落数和计算集落形成单位

1. 检查所有的平板，挑出一个菌落数最接近 30～300 以内的平板，只数一块板，如果你做了备用板，那么就数两块。
2. 数出菌落数。
3. 菌落数乘以稀释度倍数就得到原始菌液的浓度。

可以在菌落对应的平板盖子上标上数字，在每个 100 处做个记号。对于比较大的平板，电子计数笔是很方便的工具，在带有背景灯的地方能更方便的计数。

例如

100 μl 稀释样品被涂布，1/10 稀释

在 10^{-4}的稀释度的平板上数出 278 个菌落

278(菌落数)×10000(平板稀释度)×10(涂平板的样品稀释)＝2.78×10^{7}cfu/ml

培养基混浊度的变化作为细菌生长的测定

随着培养基内细菌数量的增长，光线的透过率越来越低，这个值叫吸光度或光密度，通常用分光光度计来测量。

吸光值还可以使用其他仪器测定，如 Klett-Summerson 色量计。某些分光光度计和 Klett 色量计不用取样就可以测量吸光值，因为一些特殊的三角瓶可以直接插到这些仪器中。

材料

- 细菌培养物，新鲜培养的。保证取样体积不会影响细菌的生长状态。
- 用于分光光度计调零点的培养基（空白对照）。
- 比色杯。一次性塑料或玻璃的比色杯，不要用石英杯，它只适用于紫外。
- 分光光度计。
- 移液器。

步骤

1. 打开分光光度计，将波长设定在 420 或 660 nm 处，对仪器进行调零。
2. 使用空白培养基进行吸光值调零。一些老的仪器可能不能进行调零，记下空白样品的光密度值，将样品的吸光值减去空白对照的吸光值就是样品的真实

最好使用菌液最大吸收峰处的波长值，它与培养基成分、颜色及其他性质有关，这个波长可以通过可见光波长的扫描来获得。

吸光值。

3. 摇匀菌液，随机取样。注意一定要保证无菌操作，尤其是你在测定一个生长曲线。

4. 将样品加入比色杯中，在菌体沉降前马上读数。

5. 间隔一定的时间重新读数，对于生长比较快的细菌如大肠杆菌，菌体数每 20 分钟就会增长一倍，所以要每 10 分钟记录一次。在菌体浓度很高时，OD 值可能不再与菌体数成线性关系，如果 OD 值大于 1.2，那么就要稀释 5 倍后再读，在绘制曲线时不要忘记把 OD 值乘上稀释倍数。

6. 根据时间进行记录时，要把每个时间点的吸光值对应好，在指数生长结束后，就可以结束生长曲线了。

☆ **计算世代时间（g）**。能够知道菌株传代时间的生长动力学内容是十分重要的，它可以帮助你更好地安排实验，从而得到最大的收获量以及减少时间和药品的用量。

绘制生长曲线。根据生长曲线的不同时间取样，对每个样品进行计数，根据随着时间变化而变化的细胞数的量可以计算出生长率常数 μ，根据 μ 可以计算出 g。

$$\mu = (\log_{10} Z_{\log 10} Z_0)/(t - t_0)$$

$$\mu = \ln 2/g = 0.693/g$$

其中

Z_0 为零点时间细胞数/ml

Z 为某一时间点的细胞数/ml

t = 时间

t_0 = 零点时间点的时间，或最早的时间点

μ = 细胞的增长速率，生长速率是常数

g = 世代时间，倍增时间

- 绘制生长曲线的实验要尽早开始，预先摇好种子液，以免做到深夜。
- 绘制曲线的条件要与你实验的条件相同。
- 设定好时间间隔。根据推算的世代时间定出时间间隔，如果世代时间大约为 30 分钟，那么时间间隔就设为 15 分钟；如果世代时间为 24 小时，就每隔几小时测定一次。

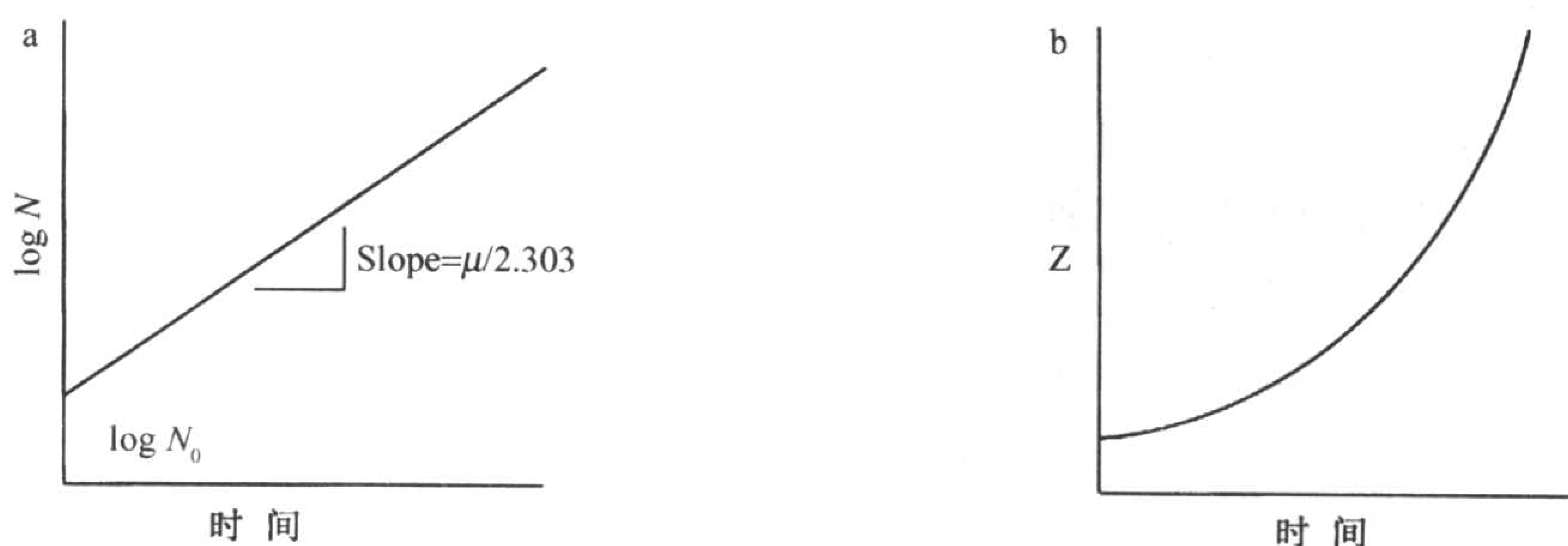


图 11-9　生长数据做图的方法比较，细胞密度（每 1ml 细胞数，N）的对数做图

a. 图纵坐标为细胞密度的对数，横坐标为时间，生长曲线为一直线，斜率为生长率常数（μ）除以 2.303，截距为 $\log N_0$。b. 图纵坐标为细胞密度，横坐标为时间，是一条指数曲线。

- 保证取样后不会影响正常生长，100 ml 是最小体积。
- 细胞数可以通过直接计数或平板计数得到。如果原来比较过 OD 值与细胞数量的关系，那么可以通过 OD 值来估计 g。如果原来没有比较过，就现在做，这种对应关系是很容易找到的。
- 种子液必须生长正常，而且要在对数期或对数晚期。如果种子液体积过小，那么停滞期就会很长，种子液体积过大又会导致根本没有停滞期，1:100 的体积比是比较合适的。
- 跟踪生长曲线，知道何时进入稳定期，有些微生物是没有死亡期的。

贮　　藏

☆ **短期贮藏**。对于大多数细菌来说，平板上的菌落以及液体培养基中的菌体在4℃的情况下可以保存几个星期，尤其是在平板上的菌落，因为每个菌落都可以经划线传代。为了延长平板上菌落生长的时间，用封口膜把最新的平板封起来。

☆ **长期贮藏**。不同的菌体要采取不同的保存方法，使用某种方法有些菌株能够保存旺盛的生命力，而有些就不能存活。每得到一株细菌，要找出最适合它的保存方法。一定要保证培养方法的正确，否则在你需要的时候，它们可能复苏不出来。实验工具的使用、培养菌体的频率以及菌株相关的替代能力都会对如何保存特定的菌株起到帮助。没有十全十美的方法，下述几个可供参考：

- **传代培养**。将菌体接种，培养并划线保存，周而复始以保证菌体总是在新鲜的培养基上生长，但这种方法不推荐。

  优点：能够快速得到菌体，便宜。

  缺点：活力降低，污染的可能性增加，表型的稳定性下降。
- **干燥**。把水除去并防止水化，这种方法常用于真菌和某些细菌，它们可以保存数年。菌体干燥时有多种基质（硅胶、纸、淀粉和明胶等，见 Snell 1991，p26）可以添加，不同方法的存活率与种属有关。

  优点：便宜，不可能被污染。

  缺点：关于使用这种方法的菌株资料很难得到。
- **冻干**。通过升华使冷冻样品的水分蒸干，干燥后，样品保存在安瓿瓶的真空条件下。可以保存 10 年甚至 50 年。

  优点：很容易做到长期保存。

  缺点：不是所有的实验室都拥有相关的设备，而且对于经常使用的菌株也不方便，还有些菌株会丧失大量活力。
- **低温冰箱中冷冻和保存**。微生物体不能供给水份，脱水的细胞被保存在低温条件下。可能是 -70℃、-140℃ 或 -196℃（液氮）。

  优点：绝大多数细胞能够很好的保藏，是推荐使用的长期保存方法。

  缺点：冰箱价格昂贵，维护费也很高，冻融的时候会对细胞产生伤害。

冷冻细菌

在培养细胞用于冻存之前**要考虑**：

- **最少的传代次数**。由于不停地转化、突变或选择突变体，污染可能会发生，得到所需的菌株应立即进行冻存。
- **在最适合条件下培养细胞**。使用最早的传代细胞，在最适合条件下培养，包括培养基、气体条件和温度等，通常越少的培养基越好。
- **找到最适合的冻存条件**。不同菌株的冻存条件是不同的，要事先考虑好冻存条件。
- **准备好新配制的冷冻用培养基**。它与常用的培养基不同，确认甘油是灭过菌的。
- **做好记录是关键的**。必须有专门的笔记本记录冻存的菌株、生长条件、日期、冻存人和存放地点。这个清单和冰箱的清单要分开，而且当你取用旧样品或冻存新样品后要及时更新。

冷冻细菌用于长期保存

材料

- 20％甘油的水溶液，灭菌
- 冻存管（特别是螺旋帽的冻存管）和架子
- 冰
- 移液器
- 移液器辅助器

> 要冻存多少管？这是根据你要怎么使用菌株而决定。由于你可以通过用接种环沾取表面的菌液而不用完全取样，这样就会有比试管更多的样品。不要忘记你可以随时培养并冻存更多菌液，所以对于那些转化了质粒的菌株、文库菌株和实验菌株，冻存5～10管，而那些最常用的冻存50～100管。

步骤

1. 培养细胞至稳定期的早期。细胞太多或太少都会影响冻存后的存活率，如果没有特异的培养基就使用基础培养基。
2. 离心弃去上清。使用2000～5000 rpm，离心10 min，把上清收集到三角瓶内，当有生物危害的液体废物处理。
3. 离心细胞时把所有冻存管的帽拧松，在每个管子上都要表明菌株、日期和冻存人，不要只标记储存用的盒子。
4. 用1/20体积的新鲜冻存培养基重新悬浮沉淀。
5. 加入等体积的20％的甘油，甘油终浓度为10％。
6. 把菌液以1 ml的形式分装到标记好的冻存管内。液体量只能少不能多，以防止结冰后体积膨胀。通常使用10 ml的移液器装满10个管子。注意，这时无菌操作十分重要。
7. 放入冻存盒。保证每个冻存管都是拧紧的。
8. －50℃以下保存在低温冰箱或液氮罐内。

> 在冻存细胞时最有用的工具就是冻存管架，好多公司都有提供，它能够使冻存管稳稳的直立，而且可以不用拿起冻存管就打开盖子。

污　染

- **平板**。每次使用平板前都要观察平板内只有一种菌落，大而老的菌落可能会有些不一样的颜色，但是菌落的质地和形状差别不大。如果你怀疑某个菌落，那么把它挑出后培养再进行鉴定。生长缓慢的有机体比生长快速的有机体更容易被污染。
- **酵母**。尽管酵母是真核细胞，但是生长和培养的方法和细菌相似。它也可以在平板或液体培养基内生长，并且使用同样的成分。实验室使用的酵母菌株的传代时间相对于哺乳动物细胞来说更接近细菌，大多数酵母生长温度为37℃。
- **酵母和细菌**不能在同一个培养箱内培养，而且操作区间也要分开。使用不同的通风橱甚至不同的房间，这都是为了防止酵母被污染，因为酵母更容易被细菌污染，使用相同的实验仪器也会造成细菌的污染。

当怀疑污染时，立即扔掉。

（郝擎菁　王维荣　黄伟达）

参考文献

Collins C.H., Lyne P.M., Grange J.M, and Falkingham, J. 2004. *Collin's and Lyne's microbiological methods*, 8th edition. Hodder Arnold, London.

Gerhardt P., Murray R.G.E., Wood W.A., and Krieg N.R., eds. 1994. *Methods for general and molecular bacteriology*, 2nd edition. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Horton R.M. 1996. Internet on-ramp. Using newsgroups: Virtual conferences on specialized topics. *BioTechniques* **20:** 62–64.

Microbiology at the WWW Virtual Library. http://mcb.harvard.edu/BioLinks.html

Miller J.F. 1992. *A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for* Escherichia coli *and related bacteria.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Pienta P., Tang J., and Cote R., eds. 1996. *ATCC bacteria and bacteriophages,* 19th edition, pp. 465–466. American Type Culture Collection, Manassas, Virginia.

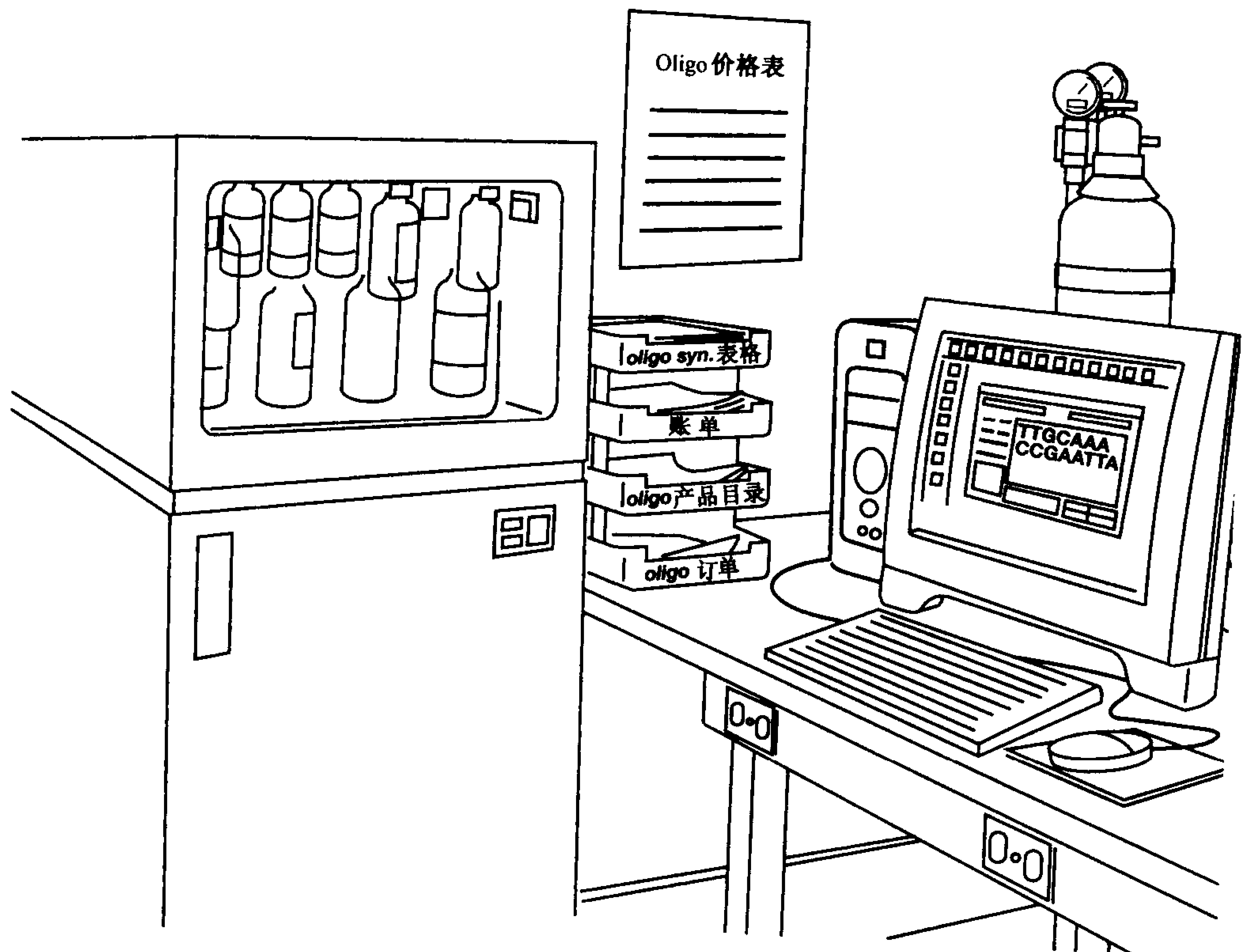
Richmond J.Y. and McKinney R.W., eds. 1999. *Biosafety in microbiological and biomedical laboratories,* 4th edition. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Protection, and the National Institutes for Health. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C. http://www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmbl4/bmbl4toc.htm

Select Agent Regulations. Select Agent Program, CDC. http://www.cdc.gov/od/sap

Snell J.J.S. 1991. General introduction to maintenance methods. In *Maintenance of microorganisms and cultured cells. A manual of laboratory methods* (ed. Kirsop B.E. and Doyle A.), pp. 21–30. Academic Press, New York.

Stanier R.Y., Adelberg E.A., and Ingraham J.L. 1976. *The microbial world,* 4th edition. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.

U.S. Department of Health and Human Services Publication. 1999. *Biosafety in microbiological and biomedical laboratories,* 4th edition. Public Health Service, Centers for Disease Control and National Institutes of Health. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.



Oligo价格表
oligo syn.表格
账单
oligo产品目录
oligo 订单
TTGCAAA
CCGAATTA

第 12 章　DNA、RNA 和蛋白质

DNA、RNA 和蛋白质是分子生物学实验室的黄油和面包。直到几年前，研究者还只是工作在“DNA 实验室”、“RNA 实验室”或者“蛋白质实验室”，而且只专攻于某一领域。而现在，研究者越来越需要熟悉所有这三种大分子的相关技术，而实验室也需要适应这三个领域，即使小的研究项目，也会涉及大量的克隆、mRNA 抽提和 Western 印迹实验。

然而，DNA、RNA 和蛋白质之间的相关问题并不相同，因为它们本身的性质大相径庭，在思考和工作时分别对待将会避免一些大的失误。

分子生物学技巧

- **熟悉所做每件事情的原理**。在做分子生物学实验时使用试剂盒或现成的方法是非常简单的，甚至是不需要思考的，但是你必须知道试剂盒的组成、它们起什么作用，为什么使用高盐而不是低盐，为什么用离子型去污剂而不是非离子型去污剂，否则在遇到问题的时候，你将不得不改变方法而不是解决疑难。
- **不要无止境地更换方法**。在分子生物学领域能得到的帮助比其他任何科学领域都多。网络上大量建议的好操作方法以及学校和实验室所讲授的技术，使你很容易沉迷于一些新奇的方法，但是如果你拥有一种行之有效的方法就坚持去做。
- **明智地购买试剂盒**。试剂盒是非常昂贵的，如果不明智地购买，那将大大浪费你的时间。比如，如果你的实验室拥有 90% 你所需要的试剂，那么购买这个试剂盒就显得没有意义了。或者如果一个试剂盒仅包含一种容易制备的缓冲液、对照 DNA 和酶，那么只需要购买酶、制备或者购买对照 DNA，或者配制这个缓冲液。
- **向其他科学家咨询结果**。因为周围有大量的参考材料，所以你可能感觉不需要问任何问题，然而和其他领域一样，一点小建议可能会为你节约几个星期的努力和金钱。
- **注意试剂的有效性**。你所购买的试剂也是人配的，也有可能无效，也有可能标签错误，或者出现其他问题。你要首先假设试剂肯定有效，因此失败完全是你自己的失误引起的。在任何有可能的方面，如果你对试剂有疑问，不要犹豫，立刻打电话给生产者或供货商，技术服务会建议你去鉴定试剂的有效性，如果失效，他们会马上准备更换。
- **做好每一个标签**。每一个样品在它到达最后处理过程中可能会更换几个管子，而每个试管即使是临时性的，其中的成分你也要很清楚。
- **离开的时候扔掉旧的管子**。成堆的离心管会很快的在冰箱中堆积起来，而且会使你因为搞混而沮丧。保留那些在下个实验步骤中你得到满意结果的试管。

DNA

DNA 是相当稳定的。这也是保存和传递遗传信息所必须具备的，但是不能因此而太随意，DNA 的污染来源主要是其他 DNA。

DNA 分离

仔细阅读并按照 DNA 分离试剂盒的说明书进行，即便是非常小的细节，比如细菌培养的 OD 值，都可能是非常重要的。

- 分离的 DNA 可以是基因组的也可以是染色体组外的。
- 研究 DNA 分离试剂盒，这些试剂盒可以是针对基因组的和染色体组外的 DNA、从琼脂糖凝胶中分离 DNA 或者从 PCR 产物中抽提 DNA。他们利用一些结合 DNA 的树脂或者滤膜，通常是一些小的离心柱，可以避免酚抽提和 CsCl 超离心。
- 染色体组外的 DNA 作为噬菌体或质粒 DNA 抽提出来。
- 大片断的 DNA，比如说基因组 DNA 必须小心操作，以防止断裂，其抽提和储存不同于小片断 DNA。
- DNA 制备可分为小量、中量和大量制备，小量制备就可以满足大多数的使用要求。
- DNA 的质量鉴定是需要的。有些过程比如 DNA 测序或者转染哺乳动物细胞需要高质量的 DNA，而其他操作如限制性图谱筛选克隆，对 DNA 的质量要求不十分严格。

测定的单位

1 kb DNA = 6.5 × 10^5 Da 的双链 DNA（钠盐）
1 kb DNA = 3.3 × 10^5 Da 的单链 DNA（钠盐）
1 kb DNA = 3.4 × 10^5 Da 的单链 RNA（钠盐）
1 kb DNA = 37 000Da = 333 个编码氨基酸
1 个脱氧核糖核苷酸碱基的平均分子量 = 324.5 Da
1 个脱氧核糖核苷酸碱基对的平均分子量 = 649 Da
1 μg/ml 的 1 kb DNA = 3.08 nmol/L 5′端
1 μg/ml 的 DNA=3.08 μmol/L 磷酸盐

表 12-1　基因组 DNA 的大小

物种	碱基对/单倍体基因组	单拷贝基因的拷贝数量
大肠杆菌	4.7 × 10^6 bp	1.8 × 10^8
果蝇	1.4 × 10^8 bp	6.6 × 10^5
小鼠	2.7 × 10^9 bp	3.4 × 10^5
人	3.3 × 10^9 bp	2.8 × 10^5

碱-SDS 质粒小量制备

小量制备可以从细菌培养物中抽提和分析，离心机 12 或 16 管足够一次制备。

材料

- 5 ml 过夜培养细菌培养物。使用 LB 培养基加入合适的抗生素培养单克隆菌体，37℃振荡培养
- 灭菌的微量离心管
- 冰
- 溶液 I（裂解缓冲液，25 mmol/L Tris·HCl pH8.0，50 mmol/L 葡萄糖，10 mmol/L EDTA），冰上预冷
- 溶液 II（变性缓冲液，0.2 N NaOH，1.0 % SDS），现配现用，室温保存
- 溶液 III（复性缓冲液，5 mol/L KAc。制备方法：配制 120 ml KAc 再加入 23 ml 冰醋酸和 57 ml 水，总体积为 200 ml。）冰上预冷
- TE
- 70% 和 100% 乙醇
- RNase A（无 DNase），配成 2 mg/ml 溶液，分装并保存于 -20℃。可以按程序制备 RNase A（无 DNase），也可以直接购买

步骤

1. 加入 1.5 ml 培养物于离心管中。
2. 10 000 *g* 离心 2 min，低温离心更佳，弃尽上清。
3. 将菌体重悬于 100 μl 预冷的溶液 I，振荡 2 min。
4. 将离心管于室温下放置 5min，细菌将会裂解而释放 DNA。
5. 加入 200 μl 溶液 II 上下颠倒离心管 5s 以混合，振荡会损伤 DNA。
6. 冰浴 5 min。
7. 加入溶液 III 并颠倒离心管 20 s 以混匀。
8. 冰浴 5 min，质粒 DNA 将被选择性的复性。
9. 12 000 *g* 离心 5 min。
10. 用移液头将上清转移至另一个离心管。
11. 加入 5 μl 2 mg/ml RNase A（无 DNase），37℃温育 5min。
12. 加入 450 μl 酚-氯仿抽提 RNase A 和蛋白质（见下面的方法）。
13. 用氯仿抽提（见下面的方法）。
14. 加入 1 ml 预冷的乙醇并于 -80℃沉淀 20 min。

> 一些操作步骤中要求在溶液 I 中加入溶菌酶，终浓度为 4 mg/ml，消化细菌的细胞壁，但是通常是不需要的。

> 上下颠倒多个离心管时可以使用试管架操作，在离心管的上部再盖上另一个试管架，让离心管呈夹心状，抓住两个试管架的末端，上下颠倒。

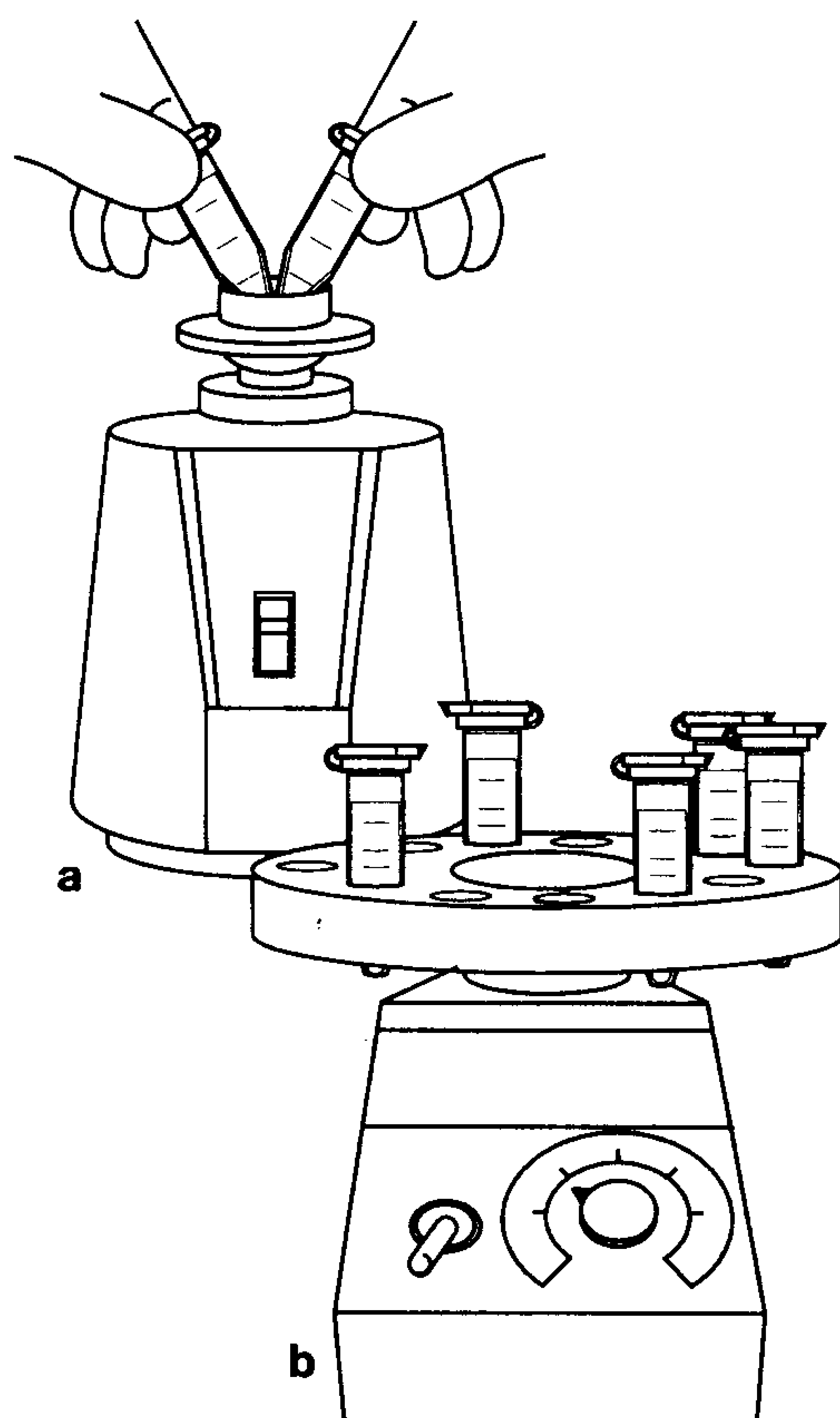


图 12-1

a. 两根管子应该底部相靠强烈振荡。b. 如果管子数目超过两个，用一个多管的蜗旋器或者用一个标准的蜗旋器再加上一个可以放置多管的接头。

15. 吸去或倒掉上清。

16. 用 70% 乙醇洗涤沉淀，离心 1 min，吸去上清。

17. 于真空中干燥 5 min，也可将离心管倒置于纸巾上吸干并干燥 30 min。

18. 用 25 μl TE 重悬沉淀，取 2～4 μl 电泳检测并将余下 DNA 于 −20℃保存。

DNA 样品的酚抽提

酚抽提通常用来对 DNA 或 RNA 样品进行蛋白质的去除。酚与水不互溶，当它们混合时会形成两相，水相和酚相。当含有 DNA 的水溶液与酚混合时，蛋白质会进入酚相，再将含 DNA 的水相取出进行再抽提和乙醇沉淀浓缩。

材料

- 抗有机溶剂的塑料管，尝试尽可能小的体积，大多数的抽提可以在微量离心管中进行。
- TE 饱和的酚:氯仿:异戊醇（25:24:1），见第 7 章。

- 氯仿:异戊醇（24:1）
- 移液器和移液头

步骤

1. DNA样品中加入等体积的TE饱和的酚氯仿，对于1.5 ml的微量离心管，总体积不应超过500 μl。
2. 剧烈振荡20s。
3. 样品在室温离心5 min，分相，这个步骤不需要很高的转速，但是通常用最高转速比较方便。小心地从离心机中取出样品，不要搅动分开的两相。
4. 在不搅动蛋白质层的情况下，用移液器小心地将尽量多的水相转移到新的离心管中。
5. 向水相中加入等体积的氯仿，重复步骤2、3和4。
6. 做好标签，现在就准备用乙醇沉淀浓缩。

> 如果在酚中加入了羟基喹啉，酚相将呈现黄色。

> 酚氯仿必须作为危险废品处理，不能直接倒入下水道。

> **为了提高产量**：如果觉得没有得到足够的水相，那么你可以在酚相加入与酚相等体积的pH 7.5的TE，对酚相再次抽提、振荡、离心。如果两次抽提的体积小于500 μl，可以将它们合并，但是最后你会发现在这个管子里几乎没有DNA。一般对酚相进行常规的酚抽提是不值得的。
>
> **为了提高纯度**：如果你觉得可能已经混入了蛋白质层，那么可以加入与水相等体积的酚氯仿再次抽提水相、振荡、离心。如果发现DNA的酶反应不能正常进行，那么DNA样品必须进行2次抽提。

DNA的乙醇沉淀

沉淀DNA样品能达到浓缩的目的，而且沉淀也会去除阻止许多酶反应的残留氯仿。

步骤

1. 于最多体积450 μl的DNA样品中，加入1/10体积pH 4.2的3 mol/L NaAc，快速颠倒以混匀。
2. 加入2倍体积95%乙醇或无水乙醇，充分混匀。
3. 样品置于冷环境中沉淀：－20℃过夜，或－70℃30 min，或干冰中5 min。

> **使用干冰进行乙醇沉淀**
>
> 用锤子将干冰砸成粉末，再将管子插入粉末；或将干冰砸成小块，置于抗冻容器中，加入95%乙醇捣成稀泥，插入管子。注意：乙醇会洗去标签。

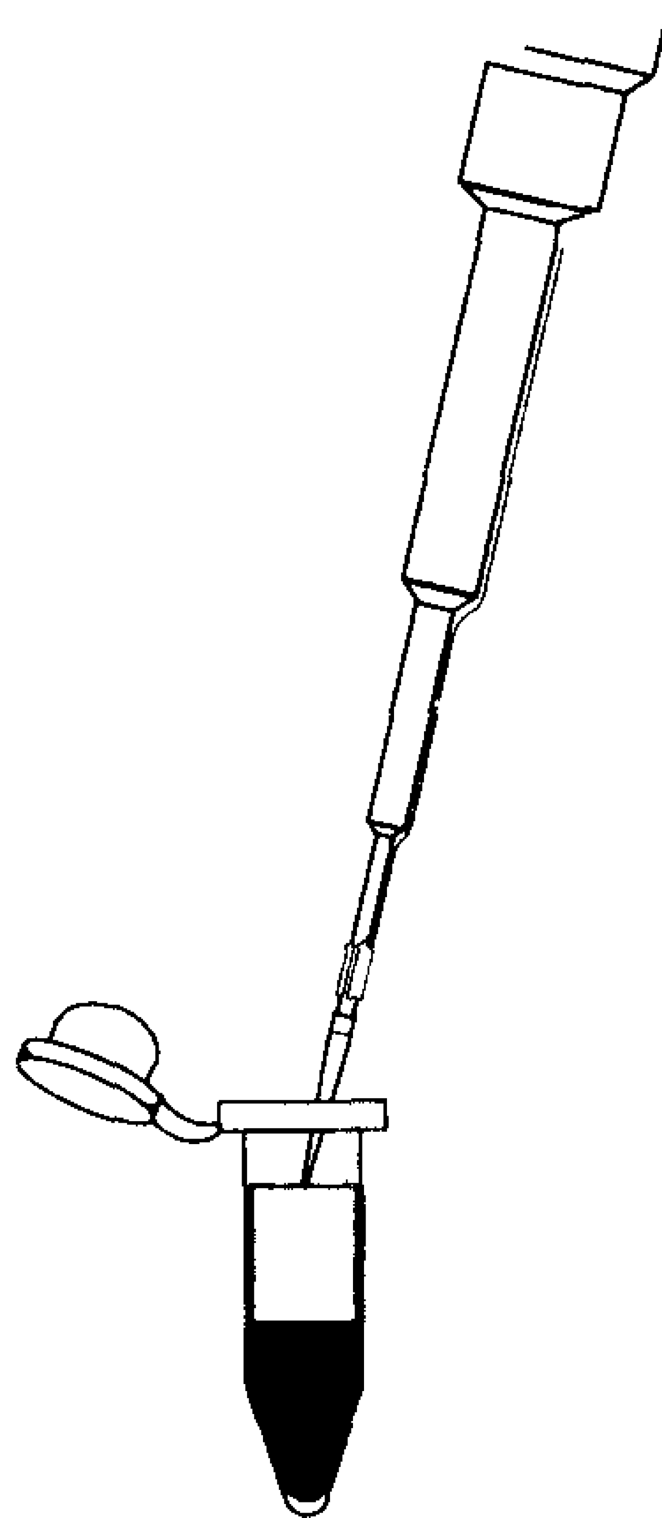


图 12-2　离心之后离心管中分为两层

上层为水相，包含着 DNA，下层为有机相，包含蛋白质。通常在水相与有机相之间有一个中间层，可见一个白色带，这是一些被抽提出来的蛋白质。在你吸取水相的时候，不要碰那个白色带。

4. 高速离心样品 15～30 min，转速至少 12 000g，如果没有冷冻离心机，将离心机置于 4℃。
5. 除去上清，上清可以倒入下水道中。
6. 离心管倒置于纸巾上吸干。
7. 预冷的 70％乙醇洗涤沉淀。
8. 按步骤 6 干燥或使用真空浓缩机。
9. 用 pH8.0 的 TE（10mmol/L Tris·HCl，0.1 mmol/L EDTA）重悬 DNA。如果沉淀不能完全溶解，加入更多的 TE，将样品保存于 4℃。

> 在处理大分子 DNA（大于 30 kb）时要特别小心，由于 DNA 样品不能振荡，只能颠倒或转动混匀。去除痕量的氯仿，代替用乙醇沉淀 DNA 样品的是，DNA 溶液需要对大体积的冷 TNE 溶液进行透析或用水饱和的乙醚抽提。

使用真空浓缩仪

如果在乙醇沉淀后，核酸中还残留乙醇，就很难用水或缓冲液溶解沉淀。如果你急用或者需要去除大体积的挥发性液体，可以使用真空浓缩设备。真空浓缩设备由离心机、真空泵、加热器和冷凝装置组成，其组合模式多种多样，相关的实验室使用规则变化更多。

步骤

1. 使用真空浓缩设备前至少 30min 打开冷凝装置。在有些装置中，可能需要加入干冰。
2. 打开真空泵。
3. 开通风管以释放离心机内的真空。

4. 离心管放入真空浓缩机，这些管子必须平衡并且敞开，管口要封上封口膜，用针头在封口膜上刺几个小孔。理论上说，在管口敞开的情况下，内容物也将完好无损，因为离心力将把内容物留在管底。但是如果有人在离心机尚未彻底释放真空之前掀开盖子，就会造成轻微的扰动，而封口膜能帮助保留你的物质。
5. 盖上盖子，启动离心机。
6. 一旦离心机达到最高转速，将通风管转向真空泵。
7. 在需要干燥大量液体或需要在 10 分钟内干燥时，才需要打开加热器。寡核苷酸需要几小时的加热离心。
8. 停止运转时，释放离心机里的真空，只有这样你才能关闭离心机。
9. 待转子完全停下时才能打开盖子。
10. 拿出管子，肉眼鉴定是否已经达到干燥，立刻盖上盖子，防止丢失干燥的沉淀。
11. 关闭真空泵。
12. 根据实验步骤清洁冷凝装置。如果蒸发了大量的液体，你需要立即清洁。

> 如果有样品需要真空处理，慢慢地释放真空，在大气压下离心。至少等 10 s 听不到空气进入离心机的嘶嘶声后再关上离心机，盖上盖子。

通过紫外分光光度计测定核酸的浓度和纯度

1. 打开分光光度计电源。
2. 读数前 20 min 打开紫外灯。可见光的灯可以立刻使用，而紫外灯必须预热，预热的时间根据灯和分光光度计而定。
3. 你的样品应该是 DNA 或者 RNA 的水溶液或缓冲溶液，用水或者相同的缓冲溶液做空白对照。可以询问实验室的相关人员得到用量和稀释倍数的建议。
4. 在匹配的石英杯中加入样品和空白对照。
5. 将波长设为 260 nm。
6. 用水或缓冲液调零。
7. 读取 OD_{260}。
8. 波长调为 280nm，重新调零，并读取 OD_{280}。
9. 使用以下公式计算核酸浓度

   1 个单位 OD_{260}双链 DNA＝50μg

   1 个单位 OD_{260}单链 DNA＝37μg

   1 个单位 OD_{260}单链 RNA＝40μg

> 只能用石英杯，不能用玻璃杯或者塑料杯，这样才能在紫外下读数。

> DNA 浓度（μg/ml）＝OD_{260}×稀释倍数×[(50μg DNA/ml）/1 OD_{260}]
>
> 例如：10 μg 的 DNA 加到 390 μl 的水中，OD 值是 0.205
>
> 0.205×40×50＝410 μg/ml
>
> DNA 浓度是 410 μg/ml

10. 计算你的总产量

产量 = (DNA 浓度 μg/ml) × (总体积 ml)

例如：从 100 μl 的样品中取出 10 μl

410 μg/ml × 0.1 ml = 41μg 或者 0.41 mg

注意：算上你从样品中取出的 10 μl，你剩下的只有 36.9 μg (41 − 4.1 = 36.9)

11. 根据 OD_{260} 和 OD_{280} 的比值来估计制备样品的纯度，这个比值对于纯的 DNA 是 1.8，纯的 RNA 是 2.0。高比值需要用酚氯仿去除样品中的蛋白质杂质。

例如：

如果样品 DNA 的 OD_{260} 值为 0.205，OD_{280} 的值是 0.114，$A_{260/280}$ 的比值是 1.8。

限制酶

限制酶通常由实验室、一个或多个系统管理。有些酶不常用或者非常贵，个人研究者不可能去购买，需要有一个人专门负责，而且多数的交流要求用标签纸或者标记来进行。

每个实验室都会有特殊的限制酶使用安排，甚至专门安排人借用罕见的酶。时刻按照实验室的习惯保持与专人联系。

- 每次去存放酶的 −20℃ 冰箱时，一定带上一个冰桶或冰盒、带标签的管子、移液器、灭过菌的移液头和处理尖利物品的废物缸，不要把带有 DNA 的管子带到放酶的冰箱。
- 每次只取出一管酶，把它放在冰盒上，然后关上冰箱门。不要站在冰箱门那里移取酶。
- 将冰桶或冰盒快速拿到自己的实验台上，上下颠倒管子，用微型离心机离心酶液后放回冰上。
- 无菌操作移取酶。
- 将装酶的管子重新放回冰箱。
- 在表单上签名。
- 如果你需要再取出另一种酶，向负责人员报告所有已用完或者即将用完的酶，不要仅仅留下一个标签。

短时间在冰箱外操作酶很关键。将酶取出冰箱前应在管子内加好所有的反应成分，酶切前将管子放在冰箱内预冷。

不要吝啬使用移液头，再次使用可能带来不利。用限制酶的时候一定要注意不要交叉污染。

如果你需要大量的酶，那么可能会耗尽库存，要在几天前与负责人联系。

限制酶的缓冲液

大多数限制酶使用的缓冲液可以根据盐的种类和浓度分为 5 种，公司通常提供各种酶适用的缓冲液。如果实验室有通用的缓冲液来源，应避免这种交叉污染的来源。要么自己拥有直接来源于公司的缓冲液，要么自己配制。

表 12-2 限制酶的缓冲液

缓冲液	标记	10×储备液
低盐缓冲液	×10 L	100 mmol/L Tris·HCl, pH 7.5 100 mmol/L $MgCl_2$ 10 mmol/L DTT
中盐缓冲液	×10 M	10 mmol/L Tris·HCl, pH 7.5 100 mmol/L $MgCl_2$ 10 nmol/L DTT 500 mmol/L NaCl
高盐缓冲液	×10 H	500 mmol/L Tris·HCl, pH 7.5 100 mmol/L $MgCl_2$ 10 mmol/L DTT 1000 mmol/L NaCl
钾盐缓冲液	×10 K	200 mmol/L Tris·HCl, pH 8.5 100 nmol/L $MgCl_2$ 10 mmol/L DTT 1000 mmol/L KCl
Tris 醋酸盐缓冲液 不含牛血清清蛋白	×10 T	330 mmol/L Tris·乙酸, pH 7.9 100 mmol/L MgAc 5 mmol/L DTT 660 mmol/L KAc

10×储存缓冲液冻在 1 ml 的水溶液中。同时储存 1 ml 的 0.1%牛血清清蛋白和 0.1% Triton X-100。缓冲液可以与大多数的限制酶混合（来自于 Amersham Pharmacia Biotech, UK）。

PCR（多聚酶链式反应）

PCR 是 1985 年由 Kary Mulis 在 Cetus 公司发明的，这是一种体外复制和扩增 DNA 的方法。

DNA 模板首先在高温下变性，当温度降低时，DNA 两侧的寡核苷酸引物与互补序列结合，在 DNA 聚合酶作用下，随着温度的缓慢提升，引物逐渐延伸，两条引物之间的区域被合成。然后 DNA 再次被变性，引物再次结合上去，DNA 的合成再次进行，这样周而复始，重复 20～50 次。

一个温度循环装置或可编程序的水浴锅，可以用来获得整个过程所需要温度的迅速变化。所用的 DNA 聚合酶是 *Taq* DNA 聚合酶，它来自嗜热菌 *Thermus aquaticus*，能在高温下工作。整个过程非常简单，问题是任何被污染的 DNA 都可能被扩增，有时甚至会超过所期望的模板。

一种 DNA 被另一种 DNA 污染是 PCR 工作者的祸害，这种 DNA 片段扩增的可能会导致样品制备的 DNA 很容易出现虚假的条带。

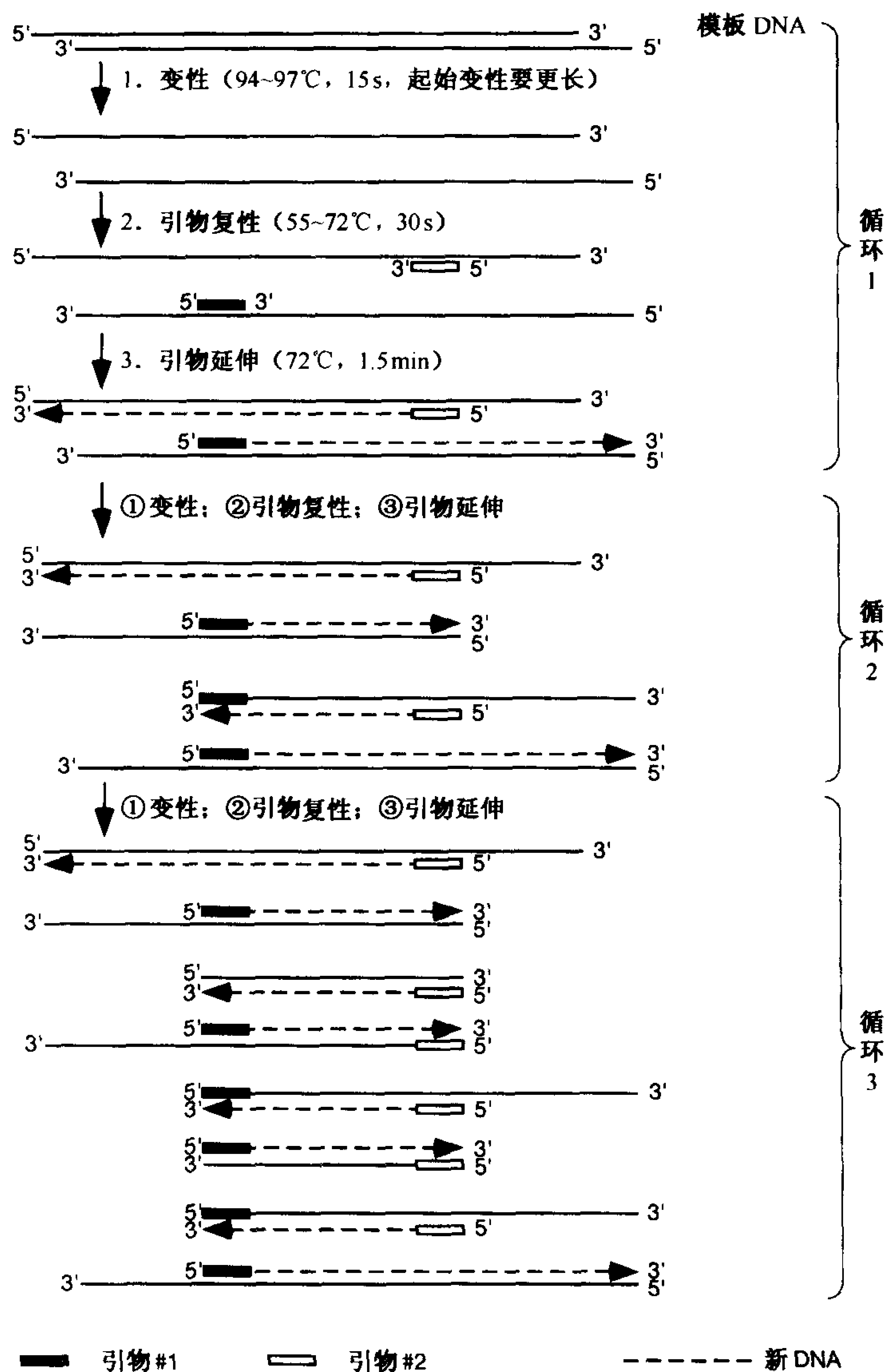


图 12-3 特殊序列 DNA 的 PCR 扩增。开始 2～3 个循环后，单链几乎没有，主要产物是双链目标序列

PCR 实验室中常见的污染来源是前一次 PCR 过程的产物 DNA，它易在移液和 PCR 操作中产生气溶胶。正因为这样，许多实验室有一个单独的样品制备区，远离 PCR 仪和任何 PCR 产物可能被暴露的区域。另一个污染源来自皮肤细胞。戴上手套。

☆PCR 的基本法则

> 在打开管子前先离心一下，可以减少气溶胶。

- 远离 PCR 仪进行样品制备。多数实验室有一个独立的样品制备区，在空间上远离 PCR 仪。无论有没有专门的样品制备区，绝不要在 PCR 仪的附近制备样品。尝试达成共识去建立一套关于样品制备的严格规则。

- 配制 PCR 反应的移液器和其他的移液器分开使用。正置的移液器会防止气溶胶和样品的交叉污染，带有滤膜的移液头也能防止样品之间的污染。
- 戴手套。经常更换手套能帮助防止来自表皮细胞的污染。
- 在反应管内最后加入 DNA。

通过物理或者酶学的方法可以防止污染。

寡核苷酸

有一些现成的软件包可以用于寡核苷酸的设计。你可以手工进行设计，但一个计算机程序可以帮助设计最好的引物，并能给出合适的退火温度。供应寡核苷酸的公司可以帮助你进行分析。你也可以上网向网络新闻组或其他研究者请教。

寡核苷酸引物由实验室或系里合成，也可以购自公司，它可能是一种粗制干燥的产物，或者是经过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离纯化、柱纯化、高效液相层析纯化的产物。你将会得到建议如何进一步纯化以及保存。样品纯度越高则价格越贵，许多实验室通过乙醇沉淀来纯化寡核苷酸，这样做可以除去有机溶剂污染，同时将寡核苷酸转变为钠盐。

乙醇沉淀寡核苷酸

1. 加入 1/10 体积 pH6.5 的 3 mol/L NaOAc 和 3 倍体积预冷的 95%乙醇。
2. －70℃至少放置 1h。
3. 10 000*g* 离心 30 min。
4. 小心弃去上清。
5. 用 100%的冷乙醇洗沉淀，离心 5 min。
6. 小心弃去上清。
7. 用 70%乙醇洗沉淀，离心 5 min。
8. 移去上清，在真空干燥器中干燥沉淀。
9. 根据需要，用双蒸水或缓冲液溶解沉淀。

将 DNA 导入细胞和微生物

分离后，DNA 经常被用于导入细胞和微生物，用来观察受体菌表型的改变或收获大量的供体 DNA 及其翻译产物。

不管用哪一种方法，细菌都必须首先处于一种可以接受 DNA 的敏感状态。细菌生长到一定的密度后用盐洗涤，敏感的细胞被分装冻存。化学方法转化的感受态与电转化的感受态有细微的差别。感受态细胞可以购买。

原核细胞

转化是细菌与分离的 DNA 重组后发生遗传基因的改变。转化通常用来扩增克隆的 DNA，另一个常见的

用途是获得大量特定的蛋白质——转化了表达载体的细菌将产生大量的 DNA 编码的蛋白质。有两种细菌转化的主要方法。

- 与高浓度的钙离子温育，导致细菌的脂膜接受外源 DNA，步骤简单快捷，几分钟就可以完成。
- 电转化。电转化能获得更高的转化效率，其最佳转化条件随细菌物种甚至株系变化而变化。

真核细胞

真核细胞的转化方法有几种，但通常都有物种和株系的特异性。这个过程被称之为转染，它是转化和感染（病毒介导的基因传递被称之为感染）的结合。

在稳定转染中，携带 DNA 的细胞会通过表达一些报道基因而被选择出来［通常是能抵抗抗生素或用 FACS 来选择表达 GFP（绿色荧光蛋白）的细胞］。细胞株是由表达细胞的单个克隆培育而来的。瞬时转染通常用于搜集 DNA 对于细胞作用的短时信息。通常，瞬时转染的使用是有局限的，转染了目的 DNA 的细胞数不确定（受转染效率的影响），每个细胞中转染的 DNA 拷贝数也不确定。另外，由于转染过程具有伤害性，而这种伤害性又难以控制，所以结果难以解释。瞬时转染的分析常常被用来作为对于转染效果的预测，为稳定表达后的表型做准备。

报道基因通常用于定位、鉴定或者分析另一个基因。它们通过与上游另一个基因的序列融合后转入细胞来研究上游序列的调控潜能，这是对一个报道基因最直接的定义。CAT 基因，编码氯霉素乙酰转移酶，是一种在真核生物中检测基因调节的经典基因。报道基因可以转入细胞或者细菌来检测外源基因是否表达，抗性基因也是个例子。

真核细胞的转染有许多方法，包括：

- 磷酸钙共沉淀法
- DEAE 右旋糖苷介导的转染
- 脂质体介导的转染
- 电转化
- 微注射
- 病毒介导的转导。腺病毒、逆转录病毒和 SV40 通常用于介导 DNA 进入细胞。

其他报道基因如：β 半乳糖苷酶基因，β 葡萄糖苷酸酶基因，碱性磷酸酶基因（如果有这个酶存在，会与底物相互作用产生颜色或者荧光。绿色荧光蛋白 GFP，是水母发光蛋白中的一种自动发出荧光的蛋白，它不需要激发或者酶反应就可以看见。

由于 DNA 的转染效率主要取决于细胞类型，所以在你浪费大量时间之前，必须调查所使用细胞的转染方法，查阅文献、上网或打电话询问操作步骤。

推荐：用电转化来获取成功。你可以用它来转化细菌、酵母、哺乳动物细胞以及许多体外细胞类型。一些老的设备不能电转化哺乳动物的细胞，但可以去购买一些配件。

载体也是决定转化转染结果的关键，在选择载体的时候，你需要大量的帮助，一些

公司如 Invitrogen 或者 Promega 提供带有可诱导的启动子以及报道基因的载体，同时在一些技术的帮助下可以在真核以及细菌中繁殖。

RNA

RNA 降解是非常严重的问题，导致多年来人们像避免瘟疫一样避免着所有 RNA 的工作，但有许多规则，如无菌技术，使每一件事情正常进行。

☆ **基本规则**

- 把所有接触 RNA 的塑料制品以及玻璃制品都高压灭菌。
- 用于 DNA 缓冲液的所有水都要经 DEPC 处理。加 DEPC 到终浓度 0.1%，再室温放置过夜，或者灭菌 15 min。DEPC 不能用于 Tris 缓冲液，因为 DEPC 将会降解成乙醇和二氧化碳。
- 避免碱性缓冲液，因为 RNA 中的羟基对碱非常敏感。
- 将 RNA 缓冲液与其他缓冲液分开放置，就不会被用错或被 RNases 污染。

RNA 的分离

盐酸胍和异硫氰酸胍盐等可以用来保持 RNA 的完整性。对于 RNA 的抽提，最好用试剂盒或者现成的试剂并且可以同时从细胞或者组织样品中抽提 DNA、RNA 和蛋白质。如果你只需要 RNA，那么试剂都要处于令人放心的状态。

乙醇沉淀 RNA

通常 RNA 可以像 DNA 一样沉淀。

步骤

1. 加入 1/10 体积 1 mol/L 的 NaOAc(pH4.8)和 2.5 倍体积冷的 95%的乙醇。
2. −20℃ 下沉淀过夜。
3. 用 70%的乙醇洗涤沉淀。

注意：当你处理少量 RNA 的时候（低于 5 μg），在 RNA 沉淀之前加入一些载体或者共沉淀物，这类物质将帮助沉淀 RNA，使得更容易看见沉淀，两种载体是分子生物学级的糖原和酵母 RNA。

选择性的 RNA 沉淀

如果是 DNA-RNA 的混合物（例如，在体外转录之后），可以将乙酸胺作为盐用于单独沉淀 RNA。

步骤

1. 加入 5 mol/L 乙酸胺到 RNA 中，终浓度为 2.5 mol/L。
2. 冰上放置 15 min。

3. 4℃高速离心 15 min。
4. 移去上清，用 70%的乙醇洗涤沉淀。
5. 用适量不含 RNase 的水或者缓冲液来重悬 RNA 沉淀。

注意：由于乙酸胺会因失去氨基而降解（该基团将影响 RNA)，所以使用的溶液应该用纯盐来配制，而且应该放在冷的密封容器中，溶液通过过滤除菌存放在 4℃。

mRNA 的分离

mRNA 在细胞总 RNA 中占较小的比例，大量的是核糖体 RNA。真核生物的 mRNA 分离方法利用了大多数 mRNA 存在多聚腺苷酸尾巴（有一些 mRNA 没有多聚腺苷酸的尾巴)。Poly(A) RNA 可以结合在有多聚寡核苷酸（dT）的树脂上，在高盐的条件下寡聚胸苷酸-纤维素可以结合 PolgA-mRNA，在低盐的情况下洗脱。这种方法可以批量或者在一个小柱子上操作。一些 mRNA 分离试剂盒可以从细胞中直接分离 mRNA。

RNA 浓度的测定

与 DNA 一样，RNA 的浓度和纯度可以通过紫外分光光度计来测量，但有两点不同：

- 1 OD_{260}的 RNA 是 40 μg，RNA 的浓度（μg/ml） = OD_{260} × 稀释倍数 × （40 μg RNA/ml） /1 OD_{260}单位
- 用尽可能小体积的 RNA 去测量 OD 值，购买和使用小体积的石英杯可以给出更准确的读数。

蛋 白 质

降解是蛋白质纯化过程中最害怕发生的事情。

☆ 基本规则

- 冰、冰、冰！当你做任何蛋白质工作的时候，手边总是有一个冰桶方便使用，管子从冰箱或者冷冻的状况下取出时马上放到冰上。
- 必须冷冻离心，因为离心会产热。
- 了解你的蛋白质。每一个蛋白质性质差异很大，热会使你的蛋白质变性吗？有二硫键吗？能反复冻融吗？如果你不知道，那么假定它不能被冷冻和再解冻是热变性的。
- 在细胞裂解以及之后的操作中，所有的缓冲液都要加入适量的蛋白酶抑制剂。

分离

用细菌或者一些工程表达菌很容易表达大量的蛋白质，但并不是说分离蛋白质也同样容易。尽管可以用融合表达蛋白质的方法来纯化，但是特定的蛋白质性质可能会改变系统常用的方法。在大规模生产蛋白质之前，先确定分离效率。

许多蛋白质分离的方法（不管 DNA 还是 RNA）都有手册来指导，但是每个蛋白质都有它自己的特点和个性，多向别人咨询。

色谱

与 DNA 和 RNA 一样，蛋白质可以进行常规的分离，或者用色谱法来分离。没有必要去想像用巨大的柱子或是用 HPLC 仪，因为色谱法也可以在一个很小的管子中进行。主要用的色谱法是凝胶过滤、离子交换层析和亲和层析。

- **凝胶过滤**，基于分子的大小对物质进行分离。

  工作原理：固定相中包含有很多的孔，只有较小的分子才可以进入。

  填料：葡聚糖（交联右旋糖苷）、Sephacryl（烯丙基葡聚糖和 *N*，*N*-亚甲双丙烯酰胺交联共聚物）、琼脂糖。

  实例：用 G50 的柱子去除切口平移反应中那些没有参与反应的核苷酸。
- **离子交换**，基于物质的电荷特性分离。

  工作原理：将蛋白质或者其他带电物质通过电荷连接在固定相上，用较高离子强度的缓冲液来洗脱。柱子的填充物可以是阴离子、阳离子或者两者都有。

  填料：DEAE 纤维素、琥石（amberlite）、Dowex、CM-琼脂糖。

  实例：在 DEAE 薄层上分离凝胶电泳的 DNA 样品。
- **亲和层析**，基于物质的天然结合进行物质分离。

  工作原理：分子的纯化具有专一性，可以通过固定相上的配体可逆地吸附。

  填料：寡聚核苷酸（dT）纤维素、生物素、肝素。

  实例：抗体与蛋白 A 的结合。

> 许多层析填料在使用前都需要浸泡溶胀，否则不能有效的工作，有一些还需要在缓冲液中放置过夜。

透析

透析被用于从样品中除去盐和其他杂质，样品被放置在一个多孔的透析袋中，只允许比孔小的分子流出。透析袋被放在大体积的水或者缓冲液中，允许内容物外流，最后通过透析缓冲液把透析袋中的缓冲液取代。

准备透析袋

透析袋在使用前要洗净，所有的操作都要带手套。

1. 根据合适的分子量截留选择透析袋。
2. 准备透析袋，做成一个口袋，于 4℃ 储存。
3. 将透析袋放在一个大体积的烧杯中，其中包含 5 mmol/L EDTA，200 mmol/L 碳酸氢钠。

> 准备好透析袋一起公用，因为很少有研究者会把它用坏，和实验室的其他人员在使用前做好安排。

碳酸氢钠	FW 84.01	使用时16.85 g/L
EDTA	FW 372.24	1.86 g/L

4. 煮沸 5 min。
5. 倒掉碳酸氢钠/EDTA，用去离子水冲洗透析袋，另外加上大量的碳酸氢钠/EDTA，再煮上 5 min。
6. 弃掉第二次的洗涤液，用去离子水洗涤。
7. 加入大量的去离子水，用铝膜覆盖烧杯。
8. 湿热高压灭菌 10 min。
9. 储存于 4℃ 灭菌的广口容器中，便于取出或者替换透析袋。如果透析袋被储存的时间超过几天甚至更长时间，就在水和透析袋中加入叠氮化钠，终浓度为 0.02%。

叠氮化钠能够防止细菌的生长，称量时小心，因为它能阻止细胞色素电子传递系统，而且也会阻止一些酶反应。叠氮化物的母液在冰箱无菌情况下以 2% 的浓度储存，使用时每 100 μl 溶液加入 1 μl。

建立透析

1. 剪下一段足够装得下要透析物质的透析袋，在每个末端留下大概 2 英寸（总共留下 4 英寸）来捆绑透析袋。(可以买到特殊的管子来进行微量的透析。)
2. 透析袋的两端都要打结，或者用透析夹封住末端。
3. 用戴手套的手打开透析袋的一个末端，另一个手拿住透析袋，把样品认真地装入透析袋中。
4. 扎住或者夹住透析袋的末端，夹住之前先挤压赶走气泡，检查渗漏，尤其注意末端。
5. 将装好的透析袋放入一个大烧杯中，最好是 2～4L 大小。
6. 加上转子放于磁力搅拌器上。通常放在一个冷的空间内透析，如果透析袋沉到了容器的底部，可以将透析袋末端悬挂起来。除非透析袋膨胀得很大或者一直被固定在容器的底部，否则转子不会将透析袋打破。

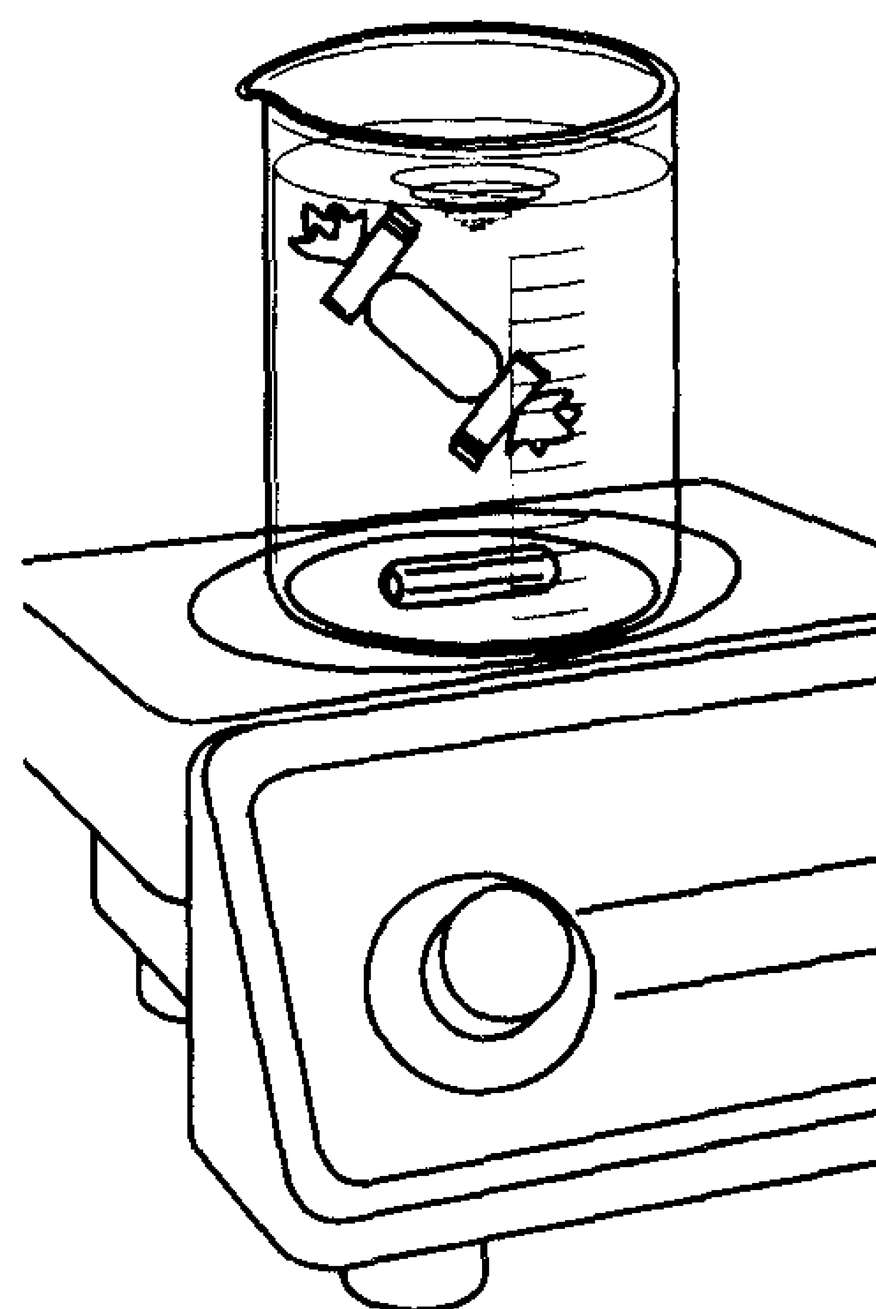


图 12-4 必须在大体积里透析

7. 常要透析过夜，如果你用的是 2～4L 的容器，就换一次缓冲液。如果是小容器，就要频繁的更换缓冲液。

细胞裂解

当分离蛋白质时，包含有蛋白质的细胞和细菌必须首先被裂解。

☆ **物理法裂解**。利用各种机器来完成，例如：

- 氮气气穴弹。氮气解压是裂解真核细胞的一种温和方法，存在于一定压力下的氮气与细胞内的氮气达到平衡。释放压力时，溶液中产生的氮气和间歇的气泡导致单个

细胞膜的破裂，但不再有进一步的细胞裂解发生，细胞器还是保持完整，而且氮气产生的压力和气温降低都会保护蛋白质不被降解。

- *匀浆器*。基本上是个搅拌机，对细胞施加剪切力。不适合细菌，除非加上玻璃珠。
- *超声处理器（超声波仪）*。超声波可以产生很多的小气泡，不仅能破裂细胞，而且会切断DNA。加上玻璃珠可以用于破裂细菌。
- *冷冻压力器*。在冷冻压力下，细胞只能通过一个很狭小的孔，所产生的剪切力和裂解力足以让细胞壁破裂。
- *珠子碾磨匀浆器*。细菌、孢子或者酵母在含有玻璃珠或者锆珠的管子中通过强烈震荡，细胞受珠子的震动和轰击在几分钟之内就被裂解。

真核细胞的裂解比有细胞壁的酵母、细菌、孢子以及植物细胞都要容易，通常用变性剂、氮气解压或者高速匀浆的方法。

☆ **去污剂**。去污剂被用来有效地裂解许多真核细胞，去污剂的使用取决于裂解细胞的用途。使用前要认真检查去污剂的来源，因为它们的质量和纯度对于成功分离蛋白质有很大的影响。

- 阴离子去污剂包括胆汁酸盐、辛酸盐、SDS（十二烷基硫酸钠）、脱氧胆酸等。
- 阳离子去污剂包括氯化十六烷基吡啶和氯化苯甲烷藻胺。
- 两性离子去污剂，例如：CHAPS和卵磷脂。
- 非离子型去污剂，例如：洋地黄皂苷、Tween-20、Triton X-100。

非离子型的去污剂都是很温和的，不会破坏核膜，它们通常用于免疫共沉淀之前裂解细胞。0.1%的Triton X-100的水溶液就可以裂解大多数哺乳动物的细胞，加到0.5%也不会对要分离的大部分酶产生危害。许多酶，如蛋白酶K，在Triton X-100的存在下仍然有活性。

☆ **蛋白水解酶抑制剂**。当细胞被裂解，内容物释放时，蛋白水解酶和其他一些降解的酶也一同被释放，除非在裂解的缓冲液中加入了蛋白水解酶。细胞自己的蛋白水解酶也会降解细胞内的蛋白质。

其他抑制剂，例如钒酸钠，一种蛋白磷酸酶的抑制剂，可以在分离磷酸化蛋白的时候加到裂解缓冲液中。

表12-3 蛋白水解酶抑制剂

抑制剂	靶向的蛋白酶	有效浓度	储存浓度	其他
抑蛋白酶肽（Aprotinin）	丝氨酸蛋白水解酶	0.1~2 μg/ml	10 mg/ml溶解在PBS中	避免反复冻融
EDTA	金属蛋白水解酶	0.5~2 mmol/L	500 mmol/L pH8.0水溶液	
亮抑酶肽（Leupeptin）	丝氨酸和苏氨酸蛋白水解酶	0.5~2 μg/ml	10 mg/ml水溶液	
α巨嗜球蛋白	广谱	1单位/ml	100单位/ml溶解在PBS中	避免还原性试剂
抑胃酶肽（Pepstatin）	酸性蛋白水解酶	1 μg/ml	1 mg/ml溶在甲醇里	
苯甲基磺酰氟（PMSF）	丝氨酸蛋白水解酶	20~100 μg/ml	10 mg/ml溶在异丙醇中	现配现用
甲苯磺酰异亮氨酰氯甲酮（TICK）	胰岛素	50 μg/ml	1 mg/ml溶在50 mmol/L的乙酸中，pH5.0	胰凝乳蛋白酶不受影响
甲苯磺酰苯丙氨酰氯甲酮（TPCK）	胰凝乳蛋白酶	100 μg/ml	3 mg/ml溶在乙醇中	胰岛素不受影响

蛋白质浓度的测定

选择哪一种

通常用的蛋白质浓度测定方法是Bradford、BCA以及在280 nm处的光吸收。实验室倾向于选择一些特定的方法，在你订购新的试剂前先**试用实验室的常规方法**。Bradford法是最好的一种可以用来满足所有目的的方法。

- 不能直接用一种方法的结果与另一种方法进行比较，必须相对浓度来比较，例如，用Bradford法测量到的牛血清清蛋白的量比其称量的值高两倍。
- 蛋白质样品的特点决定选择何种测量方法。如果知道纯化的蛋白质中没有色氨酸，就不要依赖280 nm的光吸收值。如果你的蛋白质样品中有去污剂，你就必须选择一种方法是对去垢剂不敏感的，或者你必须去除去污剂。
- 用任何一种方法来测量你的未知样品都要依据一条标准曲线，而且每次测量时都一样。如果要知道相对蛋白质的浓度，任何纯化的蛋白质都必须选择一条参考的曲线。牛血清清蛋白（BSA）和IgG是通常用的参照蛋白质，除非你要测量抗体，一般都使用BSA。

☆ **BCA**

工作原理：将硫酸铜加到BCA（bicinchonic acid）的碱性溶液中，产生一种苹果绿颜色混合物，当这样的溶液中加入蛋白质样品，Cu^{2+}离子与蛋白样品中的肽键相互作用转变成Cu^{+}，混合物的颜色转变成紫色，在562 nm下有最大吸收值。Pierce公司生产BCA的试剂。

优点：快速、灵敏、准确。

缺点：受到去污剂和有机溶剂的影响，有时间依赖性，颜色会在24小时发生变化。

☆ **Bradford**

工作原理：染料考马斯亮兰G250在pH<1时呈红棕色，与蛋白质结合后引起pKa值的变化，颜色就会变蓝，蓝色强度可以在595 nm测量。Bradford试剂可以从Bio-Rad公司购买。

优点：快速、灵敏、准确、没有时间依赖性。

缺点：去污剂的浓度不能超过0.2%，否则会干扰测量的结果。

☆ **280 nm光吸收值**

工作原理：芳香族氨基酸，尤其是色氨酸，在280 nm有强烈的光吸收。所有的蛋白质都有芳香族氨基酸（或者紫外吸收因子），在280 nm有独特的消光系数。

优点：快速，样品不会受到干扰。

缺点：没有其他方法准确。

☆ **双缩脲法（Biuret）**

工作原理：测量肽键，在540 nm测定OD值。

优点：快速，由于盐浓度的干扰比Bradford法小，可用于追踪蛋白质分离过程。

缺点：低浓度时测量不准确。

☆ **Lowry（Folin-Ciocalteu）法**

工作原理：与BCA法类似，在750 nm测定OD值。

优点：需要很少的物质。Bio-Rad公司的去污剂兼容试剂就基于Lowry法。

缺点：取决于蛋白质样品中酪氨酸的存在。

样品中的去污剂?

去污剂是蛋白质生命的一部分，因为它们用于细胞裂解以及变性蛋白质，但是它们会干扰蛋白质水平和蛋白质功能的测定。

要测定含有去污剂的样品中蛋白质的水平，可以有两个选择：

- 标准曲线的测定中包括相同比例的去污剂。得到一个准确的定量是必须的。去污剂会影响标准曲线的线性读数，你可以稀释样品到线性范围，但是对于低浓度的蛋白质样品这个方法不可行。
- 用可以带有去污剂的蛋白质测量方法。一些公司有用于带有或不带有去污剂的试剂，例如，Bio-Rad的蛋白质测量基于Bradford，但是没有提供样品中的去污剂。Bio-Rad DC蛋白质测定，基于老的Lowry法，可以有离子和非离子的去污剂存在。

如果分离蛋白质，你可能不得不去除去污剂。去污剂去除的方法取决于去污剂、蛋白质和缓冲液。一般当去污剂的浓度高到临界微团浓度（CMC）时，可以通过稀释很容易地去除，如果低于临界微团浓度，就要基于分子量来去除。你可能要为一些特殊的情况咨询别人的意见，特别是很难得到的蛋白质没有时间去让你试验，不合适的温度或者盐浓度都可能很快让你珍贵的溶液变成晶体或者泥浆。

☆ **去除去污剂的可行性**（根据Harlow和Lane 1988）

1. 离子型去污剂

- 用分子筛G25柱子进行凝胶过滤，对于一些蛋白质来说，用低于临界微团浓度的另一种去污剂来平衡柱子。
- 加入8 mol/L的尿素，然后把去污剂加到离子交换柱上，让蛋白质在8 mol/L的尿素中流动，再透析去除尿素。

对于离子型的去污剂，有一个相对较低的微粒大小和较高的临界微团浓度，尽可能地稀释和透析把树脂加到透析液中来增加交换效率。

2. 非离子型的去污剂

- 用分子筛G200柱子进行凝胶过滤，对于一些蛋白质来说，用低于临界微团浓度的另一种去污剂来平衡柱子。
- 尽可能稀释样品，对DOC透析，然后再慢慢地透析去除DOC。
- 使用快速沉降到没有去污剂的蔗糖中。

把蛋白质连接到亲和柱或者离子交换柱上，大体积地洗去去污剂，然后洗脱蛋白质。对于一些蛋白质来说，用低于临界微团浓度的另一种去污剂来平衡柱子。

3. 两性去污剂

- 尽可能地稀释。
- 透析。

抗体

抗体是一些淋巴细胞直接抵抗外来分子所产生的蛋白质，它们是免疫系统的重要组成成分，是实验室的重要工具。

*多克隆抗体*是用抗原注射动物产生的，针对相同蛋白质的不同抗原决定簇直接产生的各种不同亲和性的多种免疫球蛋白的混合物。

*单克隆抗体*是在体外制备的，是免疫淋巴瘤细胞与分泌抗体的浆细胞融合后产生的，整个培养只产生一种抗体（常是 IgG），直接抵抗外来物。

☆ 获得抗体

- 抗体可以买到，可以从其他研究者那里获得也可以自己制备。参看第 9 章有获得抗体的来源，如网站和抗体资源的网页。
- 多克隆抗体相对简单可以直接制备。不要冒然尝试制备单克隆抗体。
- 当向其他研究者索要多克隆抗体的时候，你要认真考虑，因为它们有使用上的限制。如果你实验成功了，需要更多的抗体，就必须自己制备或者自己买。

☆ 使用抗体

抗体可以用放射性元素或者酶来标记，可以让它们所识别的蛋白质变成可见的或者是可以定量的。

- *染色细胞*。标记抗体可以用来定位细胞蛋白质。
- *免疫测定*。抗体可以用来检测抗原是否存在以及其功能。

表 12-4　免疫化学技术、多克隆抗体和单克隆抗体

技术	多克隆抗体	单克隆抗体	共聚单克隆抗体
细胞染色	一般好	抗体依赖	很好
免疫共沉	一般好	抗体依赖	很好
免疫印迹	一般好	抗体依赖	很好
免疫亲和纯化	差	抗体依赖	差
免疫方法			
标记抗体	困难	好	很好
标记抗原	一般好	抗体依赖	很好

- *免疫印迹*。就是我们所知道的免疫印迹法，蛋白质是否存在以及数量都可以在滤膜上通过样品的免疫来检测出。
- *免疫亲和*。抗体所针对的蛋白质可以直接被分离和纯化。

☆ 贮藏

- 抗体最好贮藏在 -20℃，分装，冻融对于大多数抗体都不好。
- 分装好的抗体可以在 4℃ 保存至少 6 个月。
- 加上叠氮钠至终浓度 0.02％来阻止细菌的生长。

☆ **技巧**

- 要知道你的抗体是由什么动物产生的，因为在一些工作中这点会用来决定用什么样的二抗。多克隆抗体通常用兔或者猴子，单克隆抗体通常用小鼠、大鼠和仓鼠。
- 使用前离心去除所有的沉淀，在一些操作中可以阻止高背景。
- A 蛋白，从 *S. aureus* 细胞壁中分离到的 42 kDa 的多肽；G 蛋白，从 β 溶血链球菌中分离到的 30～35 kDa 的多肽，都与抗体有强烈的结合，它们被用来免疫沉淀或者定位抗体。A 蛋白和 G 蛋白都可以用来与珠子结合或者标记，适用于大部分的抗体亚类。

（李　琳　王维荣　黄伟达）

参考文献

Adams D.S. 2003. *Lab math: A handbook of measurements, calculations, and other quantitative skills for use at the bench.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Antibody Resource Page.
http://www.antibodyresource.com

Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., and Struhl K., eds. 2001. *Current protocols in molecular biology.* John Wiley and Sons, New York.
http://www.wiley.com/legacy/cp/cpmb/
Available in looseleaf, CD-ROM, and web-based format.

BioGuide-PCR
J. Weizmann Institute of Science, Genome and Bioinformatics
http://bioinformatics.weizmann.ac.il/mb/bioguide/pcr/contents.html
Lists of programs for designing PCR primers, and other PCR information.

Cell and Molecular Biology Online.
http://www.cellbio.com/
Recommended for its many links to protocol and reagent sources.

Clark D.P. and Russell L.D. 2000. *Molecular biology made simple and fun,* 2nd edition. Cache River Press, Vienna, Illinois.

Comprehensive Protocol Collection. 2000.
Ambros Lab, Dartmouth College.
http://www.dartmouth.edu/artsci/bio/ambros/protocols.html

Dieffenbach C.W. and Dveksler G.S., eds. 2003. *PCR primer: A laboratory manual,* 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Harlow E. and Lane D. 1988. *Antibodies: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

———. 1999. *Using antibodies: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Hopkins T.R. 1991. Physical and chemical cell disruption for the recovery of intracellular proteins. In *Purification and analysis of recombinant proteins,* chap. 3 (ed. R. Seeetharam and S.K. Sharma). Marcel Dekker, New York.

Molecular Biology Protocols. 2003.

http://micro.nwfsc.noaa.gov/protocols Determine the Tm, MW of oligos.

Molecular Biology Protocols on the World Wide Web. 2003. Highveld.com http://highveld.com/f/fprotocols.html

Ramachandra S. 1990. Using the HETO Vacuum Concentrator. http://hdklab.wustl.edu/lab_manual/12/12_13.html

Recombinant DNA Technology Course, Computational Biology Centers, University of Minnesota, copyright 1994–1997. http://lenti.med.umn.edu/recombinant_dna/recombinant_flowchart.html

Zyskind J.W. and Bernstein S.I. 1992. Recombinant DNA laboratory manual, *revised edition. Academic Press, San Diego.*



第13章 放 射 性

放射性是由原子核自发释放的粒子或者电磁能所产生的。正常的分子能被放射性的分子标记，而放射性的分子与正常的分子不同，这些物质能被代谢，跟踪在体内和体外标记。这项发现帮助开创了分子生物学的一些领域，放射性的应用对大多数的实验领域都是至关重要的。

在放射性的周围总是有所危险的光环笼罩着，但是在大部分实验室里用的放射性，只要正确使用不会比任何普通的溶剂或者易感染试剂危险。然而，大部分放射性的使用都有选择性，要去调查。

放射性元素的特性

- 比活性是分子细胞生物学所关注的，因为它能表明放射性的强弱。
- 与比活性相关的是放射性元素的半衰期，因为特异的有效能量代表了每秒钟有多少个粒子发射或原子裂解，那么半数原子裂解的时间就可以计算出来。
- 粒子发射有几种形式：

  α粒子（两个质子和两个中子）：^{241}Au、^{210}Po。

  β粒子（电子）：^{3}H、^{14}C、^{35}S、^{33}P、^{32}P。

  γ X射线（电磁能量）：^{125}I、^{51}Cr。

  中子：^{252}Cf。
- 当α或β粒子穿透物质时，他们会轰击所穿透分子的轨道电子产生粒子，这些粒子通常也被称为电离辐射，电离辐射可以通过穿透干燥空气和测定形成粒子的数目来观测，例如通过盖格计数计来完成。

表13-1 放射性测定的一些单位

测定	单位	描述
比活性(1g ^{226}Ra，如Ci/g，mCi/ml，或μCi/μl)	居［里］(Ci)[a] 毫居［里］(mCi) 微居［里］(μCi) 1 Ci = 2.22 × 10^{12}dpm	每秒钟多少核衰变
辐射（空气中的光子辐射）	伦琴[b]	1cc于空气中一个静电单位电离的数目
吸收剂量（在组织中的放射辐射）	拉德[b]（辐射吸收剂量）	1g物质吸收100尔格
剂量和损伤潜能	雷姆（人体伦琴当量）	伦琴当量×校正系数

a 贝可（Bq，1 Bq = 1s^{-1}）是放射性活度的国际单位，但在美国居里被广泛使用，其转化为1Ci = 3.7 × 10^{10} Bq，1 Bq = 2.7 × 10^{-11}Ci。

b 拉德是组织中放射性辐射的剂量，伦琴是空气中放射辐射的剂量，对大多数生物学组织，1伦琴可产生0.96拉德。

怎样获得放射性同位素

证明

放射性物质的销售、运输、使用和废弃处理都要按照规定进行，使用放射性的第一步就是先确定合法性。

☆ **单位许可或证明**。大部分单位里，使用或者订购放射性物质之前都要先确定你是否具有这个资格。对于资格的定义在不同的单位有不同理解，可以查阅环境健康与安全部门部门明确的要求，也可以通过面试、笔试或者实验室权威的一个可行性论证获得。

大部分情况下，被确认为有资格使用特殊的同位素之后，首先要列出你所要使用的同位素类型，咨询实验室的领导或者其他实验室成员，找出你要使用的同位素的类型，它们可能是^{32}P、^{33}P、^{3}H、^{14}C、^{125}I 或者^{35}S。

大部分学院都有一个较广泛的同位素使用许可，包括常用和非常用的同位素。然而，如果你想使用一个非常用的同位素，那么在你进行这样的计划前先看看它是否在实验室的许可范围之内。如果不在，你就要花几个月时间来等待这个许可。

如果使用^{125}I，那么先作一个甲状腺检查，因为碘会在甲状腺沉积，使用放射性碘的个人要通过规范的甲状腺检查来监测。

其他一些生物学监测也可以进行，这取决于你要使用的同位素。

☆ **实验室许可**。大部分实验室都会进行放射性操作，但你仍然要咨询主要研究人或者实验室的其他成员。

多数部门都有一个安全官员，他是实验室与环境健康安全部门之间的一个联络员，他会告诉你必须做什么，而且会对放射性原料的订购、储存、使用和废弃处理给出建议。如果你要使用实验室不常用的同位素，要首先告诉安全官员。在订购原料之前先安排好原料的储存和废弃处理是很重要的，放射性同位素的订购可以集中进行，一些特殊的同位素在实验室或者一个部门公用，安全官员应该知道如何处理。

> *在你获得资格前不要购买放射性同位素。*

决定你需要什么

实验受到放射性性质的限制，需要订购合适的同位素，你必须考虑：

- 你要标记的**分子**；
- 你要用来作为标记的**同位素**是哪一种；
- **比活性**；
- **半衰期**；
- **数量**；
- **浓度**；
- 标记的**效率**以及你所使用的**检测方法**。



图 13-1 放射性使用、储存和废弃物处理时都要贴上放射性的标记

☆ **你要标记的分子**。当然应用决定了哪一种分子应该被标记，但仍然要作出选择。

代谢标记。为了标记细胞或者组织的代谢，前体会被掺入到你希望研究的分子或者结构中去。经过标记的特殊分子你就可以知道一些相关的途径，知道什么前体被利用。DNA 合成已经很好地被研究并且描述，细胞用 5-甲基［^{3}H］胸腺嘧啶标记，它将会掺入到复制的 DNA 中，掺入标记的数目可以通过三氯乙酸（TCA）沉淀 DNA 来定量（收集沉淀，用液闪仪来计数）。在体外，掺入的数目可以直接通过对标记细胞的放射自显影来检测。

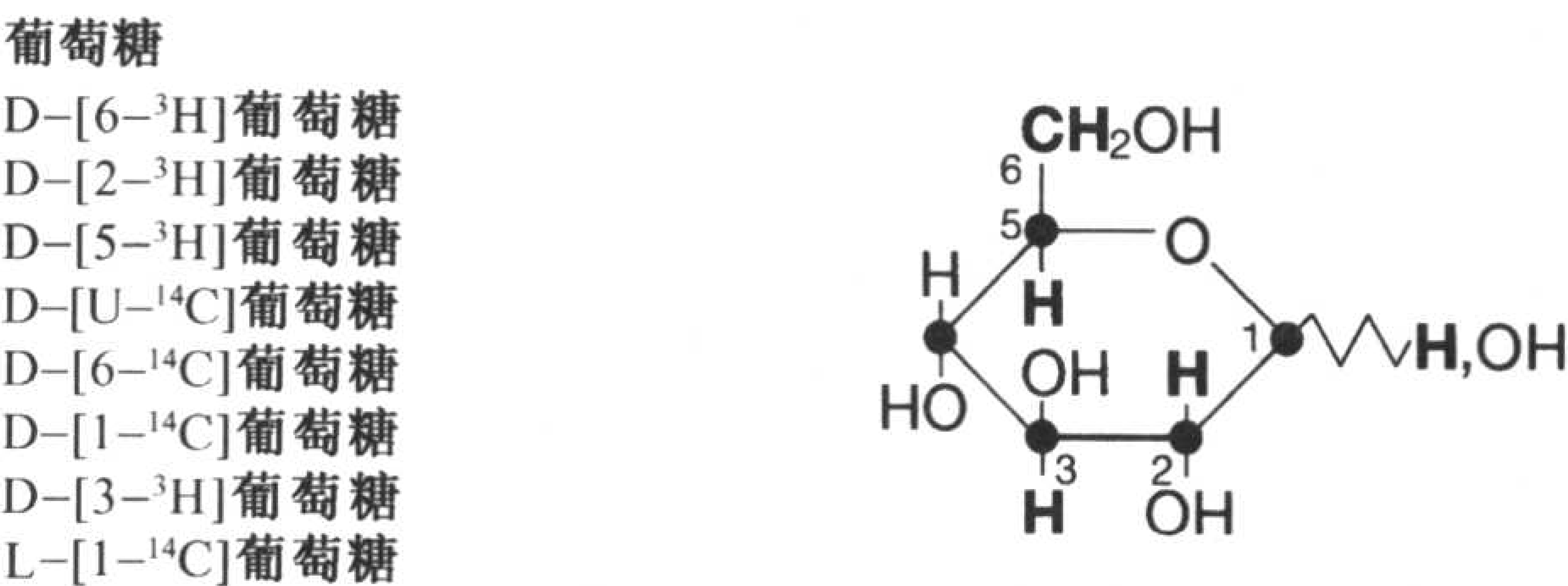


图 13-2 一些分子，例如葡萄糖分子，在不同的位置可以进行标记，根据需要确定要标记的合适位置

如果用了非特异性的标记，例如^{32}P，你就会把细胞和组织中的很多结构都标记上。虽然大量的分子被标记上，但是可以通过特异性的抗体或者可以结合的蛋白质从这些大量的标记物中分离得到你所要的分子。

分子上标记的位置可以是重要的，也可以是不重要的，但要确定标记不会被酶反应切掉，除非你要研究异构的分子。一些供应放射性同位素公司的目录以及技术部门会帮助你。

原位杂交中选择的探针。RNA、DNA 或者寡核苷酸的探针都可以被用来定位 DNA 或者 RNA 序列。一般 RNA 探针因其标记核苷酸高效的掺入率而具有极高活性，单链 RNA 探针比 DNA 探针更加敏感，因为它不会自我退火，全长的探针也可以用来杂交。寡核苷酸探针虽然标记的效率不高，但对于区别非常类似的相关序列效果很好。

☆ **用来标记的同位素是哪一种**。元素的化学编号由原子核中的质子数目决定，当一些元素具有相同的质子数，但中子数不同时，就被称为同位素。放射性同位素是一种元素具有放射活性的形式。例如，碳有 12 个质子，而放射性同位素^{14}C通常被用来作为代谢标记。

每种同位素都具有自己的放射种类和半衰期。当然，分子自身决定了使用哪一种同位素。一些放射性的元素被掺入到分子中，而其他一些则是非特异性的结合。

发射的种类决定了检测的方法、特征以及安全工作时需要防护的数量。

表 13-2 同位素放射种类和半衰期

同位素	发射	半衰期	衰变成为	能量（最大兆伏）
^{3}H	低能 β	12.4 年	^{3}He	0.019
^{14}C	低能 β	5730 年	^{14}N	0.156
^{35}S	低能 β	87.4 天	^{35}C	0.167
^{33}P	中能 β	25.4 天	^{33}S	0.249
^{32}P	高能 β	14.3 天	^{32}S	1.709
	γ 射线	60 天	^{125}Te	0.035
^{125}I	X 射线			0.027
	中电子			0.030

灵敏度对分辨率是选择所需同位素之前必须要解决的主要问题。

DNA 测序。对于特殊的需要，必须在灵敏度（更多的序列、强的信号、模糊的条带）和分辨率（更多可信的序列、较少的迷糊条带）之间达到一个平衡。

对于灵敏度：$^{32}P>^{33}P>^{35}S$

对于分辨率：$^{35}S>^{33}P>^{32}P$

在一个新情况下，最好兼顾灵敏度和分辨率，建议使用^{33}P。

体外杂交。**高能同位素**通常有较高的灵敏度，但是同位素衰变时产生的高能量粒子会穿透放射自显影用的乳胶剂产生一片扩散的银带，因此分辨率较低。低能的同位素有较高的分辨率，但需要长时间的曝光。

☆ **比活性**。比活性是单位质量物质的放射性活性的数目，如果你所要标记的分子很少，用比活性较高的放射性同位素对你有帮助。然而，始终去订购比活性高的物质可能并不是一件好事，因为它可能会过度损伤检测仪器，使你的实验更加危险。比活性并不随时间而改变，但是总的放射性数目会变化。实验需要根据衰变来调整，例如 14.3 天之后，一半的^{32}P就变成了^{35}S。

☆ **半衰期**。放射性同位素的半衰期（$T_{1/2}$）是指最初放射性原子能量减半所需要的时间。半衰期不仅决定了储存和使用后残留的活性，还决定了在废弃物处理前你可以储存同位素的时间，这仅仅对那些较短半衰期的放射性同位素而言。有部门负责废弃处理工作，建议不要去订购^{14}C和^{3}H，除非你真的需要。

> 半衰期越短，潜在的比活性（每摩尔每分钟核裂变的数目）就越大。

表 13-3 作为探针标记的同位素的特点

同位素	^{32}P	^{33}P	^{35}S	^{125}I	^{3}H
释放的能量（兆电子伏特，MeV）	1.71	0.249	0.167	0.035	0.018
分辨率（μm）	20～30	15～20	10～15	1～10	0.5～1.0
应用	大规模原位光学检测参数	细胞水平定位	细胞水平定位	亚细胞水平定位	亚细胞水平定位
标记的优点	用X射线就可以检测	曝光短	曝光短，中等分辨率	灵敏性高，曝光短，分辨率好	分辨率高
标记的缺点	分辨率低			γ发射	曝光长

例如，使用^{33}P取代^{32}P或者^{35}S就可以缩短衰变期，减少废弃处理之前的储存时间。它只有^{32}P 1/7的能量，可以减少对操作者潜在的暴露带来的危险性辐射，而且也可以提供比^{32}P更好的分辨率和灵敏度。^{33}P核苷酸和脱氧核苷酸都贵一些。

☆ **使用时间**。计划好你要购买的标记混合物，以避免延长储存时间。要考虑同位素的半衰期，如果你的混合物有14天的半衰期，那么在实验的3周内不要犹豫立即订购。

☆ **数量**。不要等到需要时才购买，1 mCi可能要花50美金，2 mCi可能花60美金，只有在确实需要的时候再尝试购买这样大量的同位素。钱应该花在那些半衰期长的同位素上，你甚至被鼓励做一些无意义的或者无用的实验来用光它。

关注那些做放射性混合物的公司，不可能你所需要的同位素都刚好替你准备好了，检查产品的目录以及混合物的载运表格。

订购

放射性同位素的订购和运输通常被集中控制。多数情况下，学院自己被授权去购买放射性物质，环境健康与安全部门将视察所购买放射性同位素的分配。你必须检查订购过程：与其他一些试剂的订购不同，当你收到订单时认真检查，所有的卖主都有可能出错，确认在订单上出现的物质的量以及体积都是正确的。

当产品到达时，保存好那些数据表格，这些表格包含放射性数目、使用、储存条件等重要信息。

做放射性实验

拉德法则

- **开始实验前一定要获得必要的实验室以及学院授权**。实验室中放射性的使用是联合控制的，没有授权的使用是非常危险的，会导致实验室的关闭。
- **在为放射性专设的地方进行实验**。可能是实验室的一个角落，检查一下哪些同位素可以在那里使用，许多实验室容许低能β发射或少量的高能发射物质放在那个角落

里，而大量标记的实验要在另一个区域来进行。

- **所有的工作表面都要用大量的纸或者盘子来覆盖**。实验结束后把这些纸和盘子都拿走。
- **碘化、超声、匀浆的时候会有气溶胶产生，在通风橱中进行**。在通风橱中进行碘化必须要经过环境健康与安全部门部门的许可，如果可能的话在防护罩的后面打开马达或者瓶子。
- **做放射性实验时一定要穿上实验服和戴上手套**。当你做^{125}I 和大量^{32}P 的时候，要用两双无粉的乳胶手套并频繁地更换。
- **经常检测你的工作区域**。在工作**前**、实验**进行中**和实验之**后**都要检测，通常移液头都会被污染，不要忘记检查检测器自身。
- **检测自己**。当你在做 γ 射线和高能 β 射线时，一定要带上合适的放射量测定计，工作时要不断地检测周围一米区域的放射性，特殊情况下要多次检测你的手套，工作结束后要检测自己。
- **积累最少量的放射废物并通过合适的方法处理**。在开始实验前，应该知道放射性的玻璃仪器、废物、溶剂和一些生物危害物品应该放在哪里。
- 当实验用量超过 10 μCi，**应通知实验室的其他成员**。在你将要使用到的仪器上贴一个标签，如离心机和培养器具，以便实验室的其他人员不会去动你的东西，确保他们受到的辐射最小。
- **记录所有的获得物、应用和放射性的废弃物质**。这些信息环境健康与安全部门部门都需要。

安全问题

安全吗？没有东西比放射性更为可怕，孕妇不要靠近，实验室的成员可能拒绝轮流处理放射性废物的工作，然而大部分使用放射性物质的成员要把它们处理在一个比实验室常用物质更少危险的水平上。

千万不能轻视做放射性工作，必须要考虑好每一步，从放射性原料开始到废弃实验残留都要谨慎小心，不能有任何猜测的成分，你**每一次**都必须遵守的规则。一旦有错误发生要保护自己。

是的，通常遵循规则可以安全地进行放射性工作，但也有一些警告：

- **有些同位素比其他同位素会造成更大的危险**。高能量的 β 同位素（^{32}P）比低能量的同位素（^{35}S、^{3}H、^{14}C）具有更大的潜在危险，所有的 γ 射线的同位素即使释放低能量（如^{125}I）也会穿透你的身体。

> 工作中使用低能量的同位素也是一种危险。

- **大剂量同位素比小剂量具有更大的危险**。将实验的规模及样品的数目都最小化。
- **用同位素进行特定的操作比其他一些试剂更加危险**。标记核苷酸比标记整个细胞并分离细胞混合物要安全，因为后者会涉及更多的标记、细胞裂解以及大量的离心和移液。越简单的操作就越安全。放射性碘标记蛋白质比大多数常规实验室的标记实验都要危险，因为碘本身就是不稳定的。

- **你可以控制好你自己，但是你不能总是提防其他人。**Macho 现象在放射性的领域里被体现得活灵活现。尽管一些实验室具备所有需要的安全设施，但是还是有一些人会忽视这些规则，他们认为不用任何防护来显示他在处理放射性时的大无畏。
- **失去理性的恐惧是危险的。**在做放射性实验的时候不要害怕或者妄想，你应该有丰富的知识而且必须保持警惕，但是如果过于害怕就会有安全上的危险。
- **孕妇。**如果是孕妇，那么要通知环境健康与安全部门，要为一个没有出生孩子的安全考虑。有一些政策规定了辐射的数目，大多数的放射性化学家认为，在标准实验室剂量下使用都是安全的。有些溶剂和生物试剂比规范使用的放射性同位素更加危险。高能量的射线，尤其是 mCi 级剂量有许多问题，你可以选择推迟你的实验。孕妇怀孕后 8～15 周是对放射性最敏感的时期，这个时期非常容易产生畸形。另一个选择就是让别人替你去做任何危险的实验操作。

在使用放射性之前，先要确定这项工作在哪里做是安全的。如果不能确定，找另一个实验室去做实验。如果你认为有些事情不安全需要改变，那么就设法改变吧，不要在安全问题上与任何人妥协。

减少外部暴露

减少在放射性下的暴露是切断危险的关键：

防护（罩）
保护服
控制暴露时间
控制与放射源的距离
正确的监测

在你使用和处理之前先检查一下防护罩，因为它经常被污染。

☆ **防护罩。**在放射性伤害到你之前就先阻止放射性在空气中的穿透。不同的同位素会有不同的防护要求，所以不要想当然地认为你所找到的防护罩是合适的。防护罩通常就是一个挡板，它在你的身体与操作区之间建立一道防线，但是在不同的工作情况下（如在显微镜下或者在培养器皿中工作）需要不同的防护罩。向环境健康与安全部门咨询合适厚度的防护罩。

衰变粒子的能量和种类将决定放射性的穿透能力，也决定了保护使用者所必须的防护罩等级。

- **低能量的** β 射线如氚**不需要防护，因为**它不能穿透皮肤外的死皮层，当然在防护罩后面工作会减少多余的放射性对衣服的危害，可以在放射性区域建立起隔离。
- **高能量的** β 射线（最高 20 mCi）**需要一个丙烯酸的防护罩。**1cm 厚的丙烯酸防护罩可以阻止所有的 β 射线，对于高到 10 或者 20 mCi 的放射性物质都是合适的防护。
- **高能量的** β 射线（大于数十 mCi）就需要至少 1cm 厚的丙烯酸板，也需要其他的一些防护。因为 β 射线被防护物质吸收后产生了相对高能量的韧致辐射，针对这种辐射就需要有效的防护。可用镀铅的丙烯酸防护罩或二级铅防护罩放在丙烯酸和工作者之间。
- X 射线和 γ 射线需要合适厚度的铅或者铅-丙烯酸防护罩来防护。

不仅要防护好自己，也要替实验室的其他人防护。如果你在使用放射性，就要确定实验室的其他人没有被辐射到。一个简单的厚板防护不能保护在另一边工作或者在防护罩后工作的任何人：你需要使用侧板、工作台或其他的防护罩。

所有的放射性同位素在储存和运输中都要放在具有防护功能的容器中。

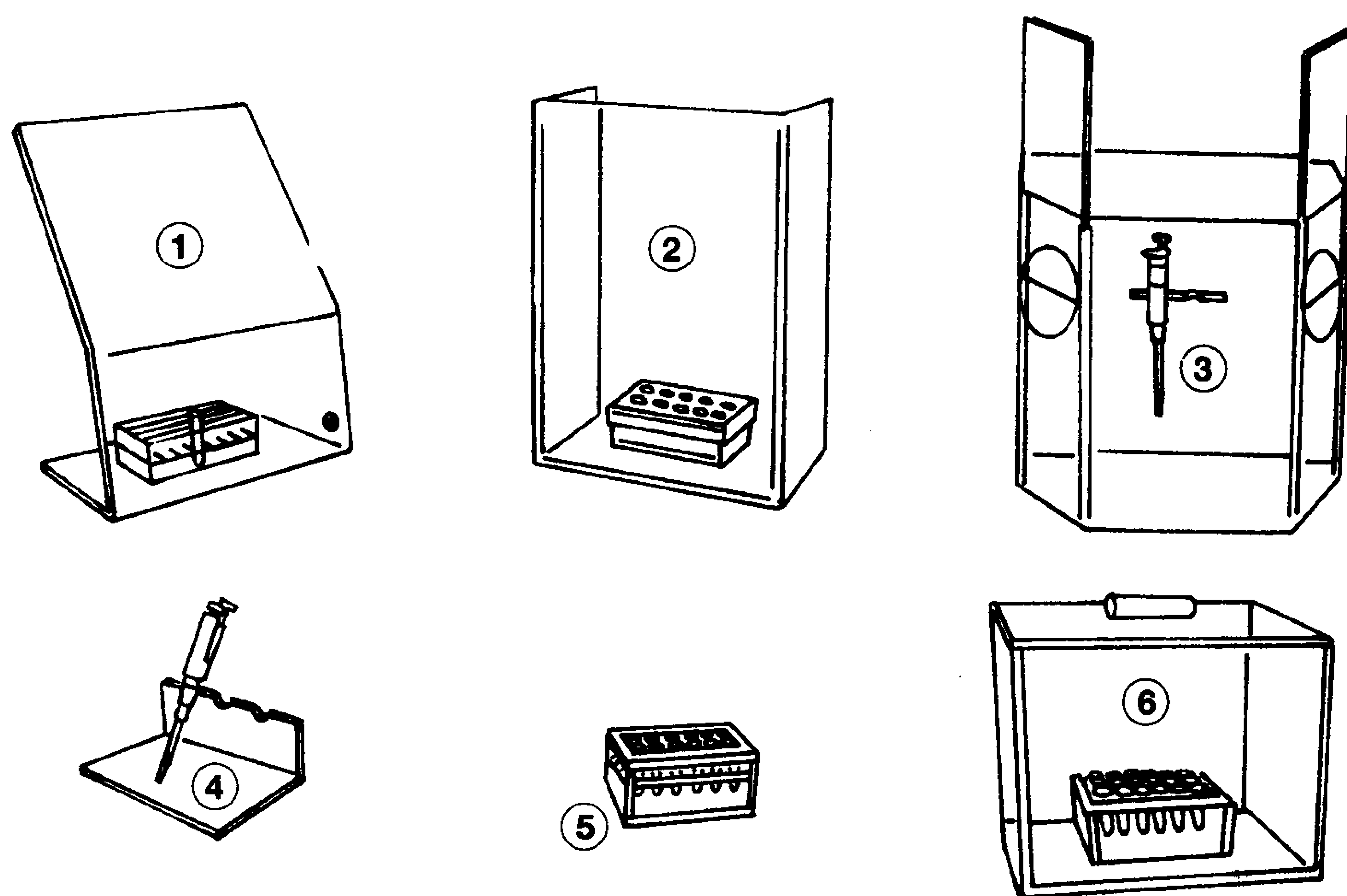


图 13-3　放射性的物质在储存运输以及实验中都需要防护

①、②、③显示的是工作的时候增加防护程度的防护罩和工作台。④手和手指受到的辐射最多，可以用一个手的防护罩来保护。⑤放射性样品要放在有防护功能的容器中。⑥在冰箱或者冰柜中储存时，所有的放射性都应该被放在一个有防护功能的容器中。

☆ **防护服**。不穿保护服不能处理放射性物质。许多化合物，包括一些用氚标记的，（很难被检测）都会通过皮肤被吸收。

必须始终戴手套，手套不仅要适用于放射性，也要适用于物质的化学特性。如果你使用的是有机溶剂溶解的同位素，要向环境健康与安全部门咨询。标准的乳胶手套对多数放射性操作合适，只要可能，戴上两层手套，如果外面的手套污染了，就立即脱掉。手套应该按照放射性固体废物来处理。

放射性实验所穿的防护服不要在其他非放射性实验的时候穿，可以穿一次性的实验服来进行放射性工作。

在你把工作服送洗之前用盖革计数计或者 γ 检测器检查一下，如果已经被污染了，就让环境健康与安全部门的人来处理它。

☆ **暴露时间**。减少使用同位素的时间，你的实验进行得越顺利，可能被辐射的概率就越小。在设计实验时尽可能晚地加入标记。在没有同位素的情况下先做一次实验，确定你所需要的所有东西（管子、废弃容器、试管架、大部分零散的物质）在实验的时候不用去找。

☆ **与放射源的距离**。保持你的身体远离工作区。至少离开 1/4 剂量放射源的双倍距离，放射性的强度随距离的平方减少。

☆ **监测**。通过估测所受辐射的数量，可以改变实验行为。

盖革莫勒检测仪（通常称为盖革计数器）是一种充满气体的检测仪，实验室中大部分的计数器都是一个数字式或者类似仪表的仪器。不同种类的盖革计数器具有检测不同电离辐射的能力，但是大部分都不能检测 γ 射线。盖革莫勒检测仪通常需要环境健康与安全部门来检查并校准。

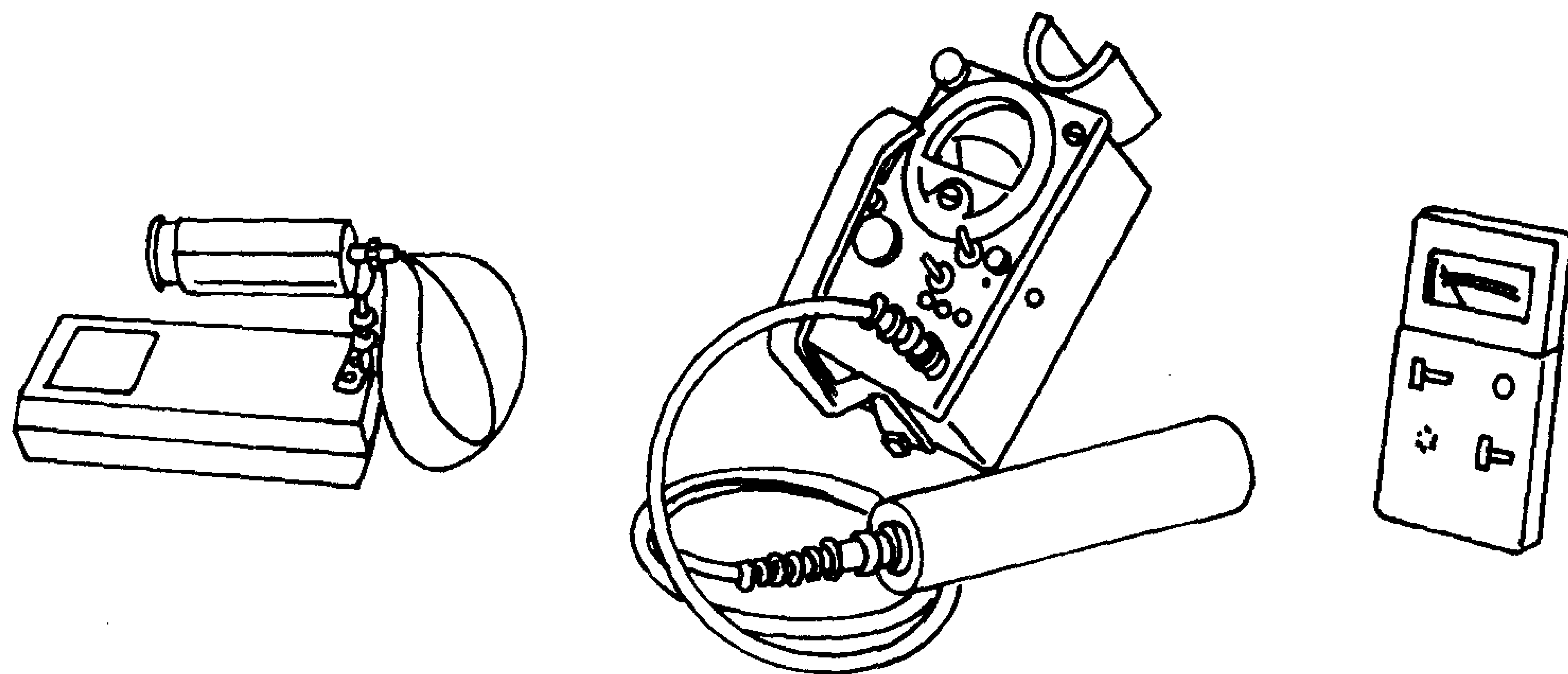


图 13-4 实验室有多种型号的检测仪

不能通过一种检测方式就决定放射能。有 β 和 γ 射线检测仪，每一种检测仪对于不同的同位素都有不同的效率。要确定用一个能检测到你所用放射线的仪器。把检测仪放在检测物上方 1 英寸处，缓慢移动检测放射性。

NaI（Ti）（γ）检测仪可以检测 γ 射线以及高能 β 射线所释放的韧致辐射，如^{32}P。

个人放射量测定器（通常被称为徽章卡），都是戴在身上的，记录身体被放射线辐射的数量，有不同种放射量的测定器（例如，胶片式徽章卡或热放射量测定器 TLD 来测量高能 β 射线），单位实验室或者一些放射性安全部门会决定哪一种放射量测定器可以戴在身上以及如何检测。它们的形状可能像一支笔或者一个徽章。放射量测定仪也有专为手或者手指测量设定的，如果要手动做一些高能 β 射线的实验，你就可以用到它。

工作区域应该擦洗干净，然后再规范地测量，Q-tips应该被放在手边来做这件事情，也可以轻微打湿来提高效率。可以实验室自己做，也可以让环境健康与安全部门来做，这对于氚很重要，因为它所释放的低能 β 射线不易直接被检测到。

γ 检测仪及盖格计数器的探头都很容易被污染，探头可以用塑料包上，把手用橡胶材料。

在规定时间间隔内，拿掉你的射线计量器，戴上新的。不要把它们都堆在抽屉里，也不要放在容易被辐射到的地方。工作时，记得一定要戴上。

工作程序

建立一套实验规则和程序通常会使你做实验时不会太担心。除非很少做放射性实验，否则你应该有一个专门的区域来做这项工作，它可以是实验室很普通的一个区域，也可以是一个很小的角落，但是在这个区域里工作的时候，一定要把实验过程中用到的东西都准备好，如移液器、吸出器、废弃缸等。

☆ **在开始实验前，要检查：**

- 操作步骤。操作步骤应该详尽，才能使你不会在实验过程中不得不对一些操作做出决定。把步骤挂在实验台附近，让你可以不用翻笔记本就可以看得到。
- 正确的试剂和仪器。实验过程中最好不要打断注意力，当你在写操作步骤的时候就想好你的实验，列出你所需要的东西。如果样品很危险，尽可能使用那些可以反复利用的玻璃仪器，如果样品不是很危险，也要少用一次性的物品。

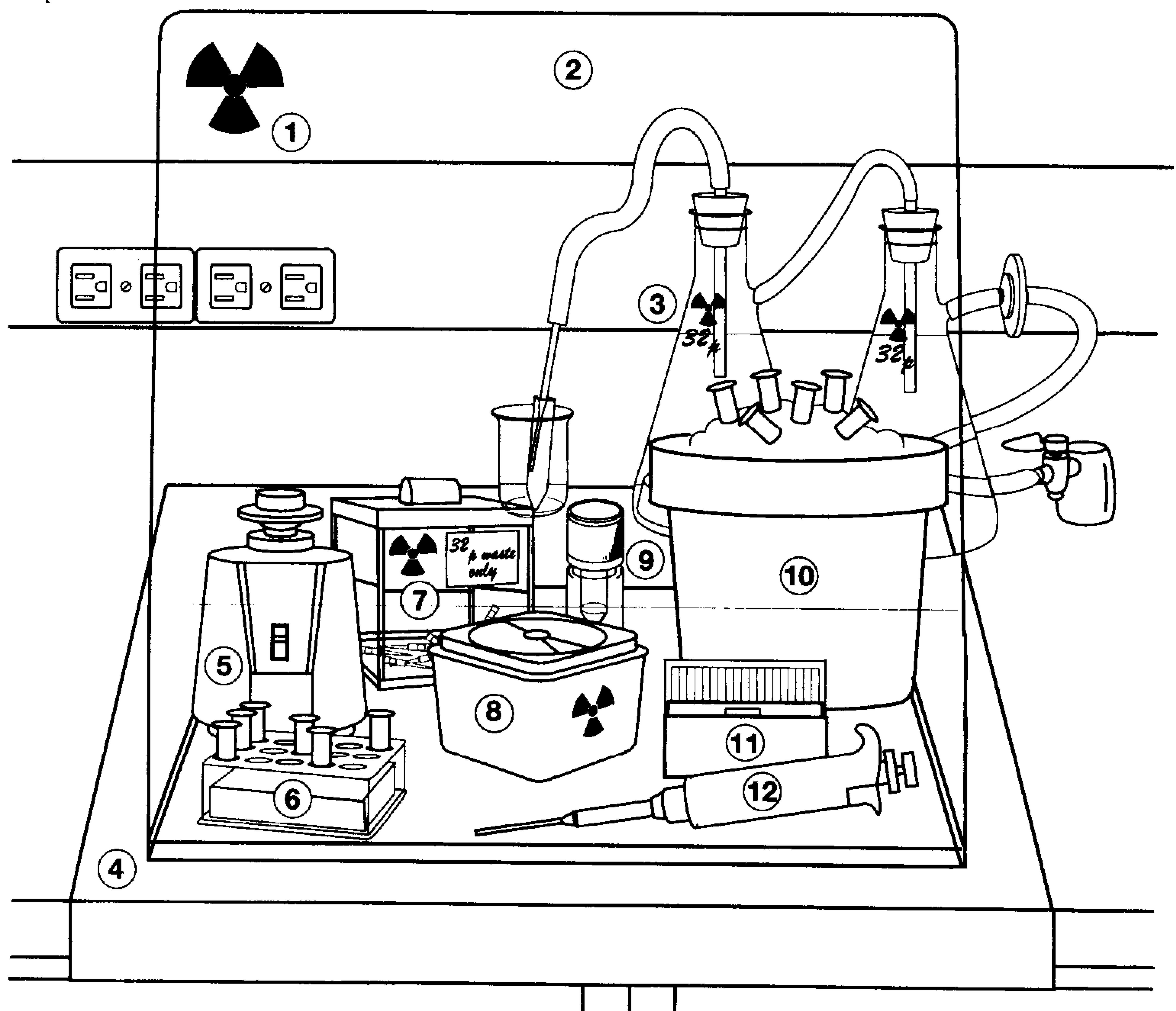


图 13-5　放射性工作区

因为你的工作有一些易污染的试剂，所以在做放射性实验时要尽量减少手的运动（避免造成事故或洒出）。①放射性的标记；②防护罩；③抽气装置；④实验台用纸；⑤涡旋振荡器；⑥架子上的样品；⑦干的废物容器；⑧尖利物和移液头容器；⑨放射性的瓶子；⑩冰桶；⑪移液头；⑫移液器。

- *废物处理*。工作时纸巾、尖利物、上清、用过的手套等都应放置在安全场所。

  大多数放射性工作区都要有一个专门的抽气装置（见第 3 章），每一种同位素（长半衰期的同位素放在一起，短的放在一起）都需要自己的一套设施。与不同种类的同位素不一样，易感染的废物以及危险的组织废物要另外用一套设施。详细的情况咨询环境健康与安全部门。
- *安全性*。在工作区的下方要放一些纸或者盘子，它们可以用来盛溢出物，使得最后清理的时候更加容易。要确定你所使用的防护罩和样品存放容器是合适的。

☆ **实验过程中：**

- *考虑无菌*。多数的无菌设施都是用来避免样品污染。在做放射性实验时，主要目的就是要保护好自己，思考无菌会帮助你减少放射性辐射。
- *不要中途接电话或者记录笔记*。实验时不要戴着手套去接触任何东西，那样会使你戴手套根本没有意义。在实验的过程中可以用一支专门的笔来简要记录，之后立刻转移到你的实验笔记本上。
- *集中注意力*。在进行放射性的实验时，不要说话。

> 当你直接做实验的时候常常会受到放射性的辐射，有一些情况需要尤其小心：
>
> - **打开放射性瓶盖时**。当你打开瓶盖的时候常常会产生气溶胶，所以最好在防护罩后慢慢小心地打开容器的盖子。
> - **对于冻存的瓶子**。在你想要移液时，一定要先确定瓶中的内容物全部溶解。如果你用一个移液头作为探头去触一下冻融物，发现已是液体了，就是溶解了，可以拿出瓶子放在台子上或者地板上。
> - **离心放射性的样品**。离心机会不可避免的被放射性污染。大多数实验室都有专门的区域来做放射性的实验，如果没有不要随便用离心机。如果可能的话，最好把转子搬到防护罩的后面再拿出管子。
> - **放射性的转移**。即使是仅仅要去楼下，也要把样品放在聚丙烯或者铅的容器中。
> - **培养标记好的细胞**。培养器皿是固体的，也需要保护和防止辐射。例如，^{35}S，在培养的时候会挥发，会使样品架子和顶部都被污染，所有的小瓶和盘子都应该被放在聚丙烯的容器或者防护罩的后面。而且在你要进行放射性培养的前一天就通知相关的实验室人员，以便他们帮你安排好。

☆ **实验后：**

- **清理**。绝对不能丢下什么东西，清除台子上的纸，把它们丢弃在合适的放射性废物处理箱内。如果有一个盘子，先用纸巾把它擦干净，或者洗净。所有可以再次使用的玻璃器皿要清洗干净，抽气装置中的液体倒到放射性废液缸中，扔掉那些污染的盒子，除非它们都被防护了。否则清理时都要作为放射性垃圾处理。

> 通常可以使用的清洁剂是 CountOff，由 New England Nuclear 生产，使用前要稀释，水槽边上放一瓶稀释清洁剂的喷瓶。

- **检测**。检测工作区和所有你使用的工具，检测移液器、笔、试管架、还有离心机。实验之后培养器皿也要检测是否污染，尤其是使用过挥发性的底物，如^{35}S。检测地

板、自己的身体还有实验服、防护罩，也要检测检测仪本身。

- **再次清理**。用清洁剂擦所有的东西。清洁剂是去污剂或者一种温和的酸，取决于要清理的物质，咨询环境健康与安全部门。对你所使用的东西都要认真处理，要清理好离心机内部。
- **记录**。在实验操作过程中不可能完全写好记录，那么这个时候来写，记录下放射性物质使用以及处理掉的放射性物质。

放射性的实验检测

适用性不同的和好的检测方法在做放射性工作时是被激烈讨论的问题。

放射自显影

放射自显影是一种在固体样本中定位和记录放射性的方法，放射性的样品可以是凝胶或者滤膜，甚至是细胞或组织样品。

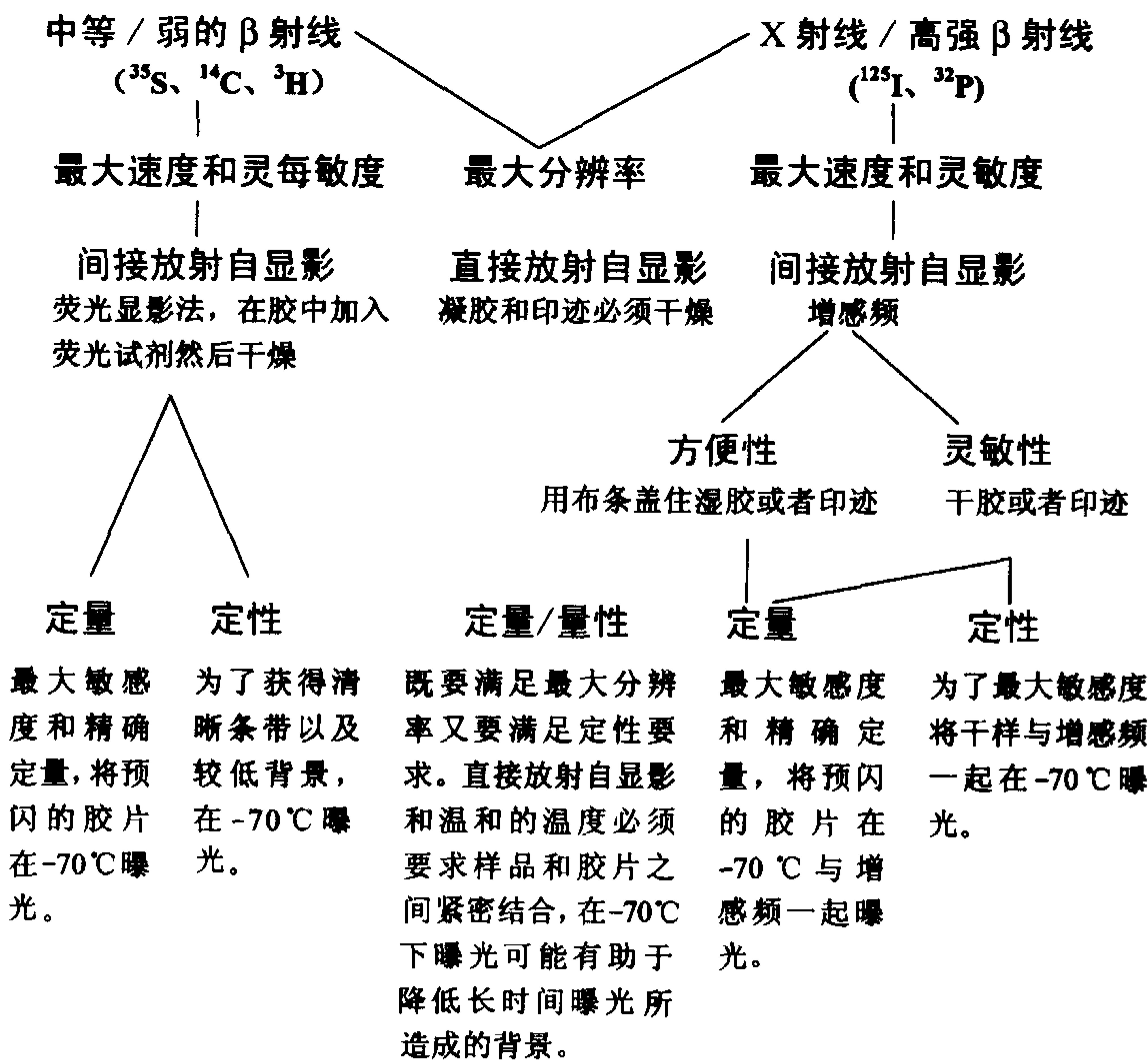


图13-6　根据需要选择放射自显影时使用的同位素

放射自显影适用于

条带迁移测定	体外转录	RNA酶保护
碳水化合物分析	激酶测定	RT-PCR
CAT测定	文库筛选	S1核酸酶作图

细胞增殖	微卫星作图	狭线印迹
克隆杂交	Northern 印迹	Southern 印迹
DNA 指纹	噬菌斑挑选	SSCP
DNA 定量	引物延伸	短序列随机重复
DNA 测序	蛋白质凝胶	TLC
DNA 类型测定	RAPD	Werstern 印迹
斑点印迹	RFLP	VNTR
酶分析	RNA 定量	

放射性同位素**检测和记录**可以通过胶片或者磷光屏放射自显影进行，样品在放射性检测前要进行正确处理。样品制备主要需要减少样品基质使得放射性的信号不会过量或者出现误差，而且粒子穿过的距离要尽量短，这就需要干凝胶、滤膜或者细胞组织样品以减少水的成分。

☆ **胶片放射自显影**

原理 β粒子或者γ射线与感光乳剂的卤化银晶体相互作用，产生图像。

优点和缺点 大多数实验室有胶片自显影设备，包括暗室、照片处理机和胶片盒。固定样品或者照片都不需要特殊的盒子，包有铝箔纸的平板就可以不透光，可以使样品和胶片紧密均一的结合在一起。同样，胶片和胶片处理机可以用于非放射性的检测方法，曝光时间要比磷光屏显像长。放射性密度仪可以定量数据，但这些数据必须手动输入电脑，然后进行分析。

增感屏的使用 增感屏可以在检测放射性标记样品时，减少曝光时间，增强敏感度，但同时也会降低分辨率。传统的增感屏只对^{32}P和^{125}I有效，而对^{3}H、^{14}C、^{35}S、^{33}P无效。增感屏是通过放射性标记颗粒的能量与增感屏上磷产生的光子而起作用的。使用增感屏时，同位素放射性颗粒必须穿过胶片达到增感屏，因此如^{3}H、^{14}C、^{35}S、^{33}P缺乏能够穿透屏幕的能量不能起作用。

增感屏工作的最佳温度是－60℃至－80℃，因为低温能够降低使胶片成像的化学反应的活化能。如果室温下使用增感屏，那么成像所需要的能量就更多，也就失去了使用增感屏的优势。也有适用于低能或者中能放射性同位素的增感屏，这些增感屏不依靠同位素的能量去穿透胶片。使用两块增感屏可以增加敏感性，但是会降低分辨率。如果使用两块增感屏，请按以下顺序放置：屏/样品/胶片/屏。

> 增感屏必须保持清洁，否则光子不会到达屏幕。存放增感屏时应远离灰尘并用抗静电溶液定期清洁，用软布轻轻擦拭。增感屏寿命短，一般5年后要更换。

放射性信号传到胶片，因为胶片的两面都有乳化剂，在胶片两侧放上屏可以增加胶片两面的成像，因而有效增加所检测的信号。

> 预闪，将胶片短暂曝光。通常可以增加信号的线性，但通常并不需要。

加强弱β射线——荧光成像 一些同位素，如^{3}H、^{14}C、^{35}S只能发出弱β射线，容易被样品吸收而无法达到胶片。将凝胶或膜浸入闪烁剂，弱β粒子就有机会将它们的能量传递给闪烁剂分子从

而产生光子使胶片感光。

在用闪烁剂处理之后，凝胶需要干燥并在-70℃与胶片和增感屏一起曝光。

胶片　使用蓝底色的放射自显影胶片。蓝色使眼睛更加舒适，并且使其更容易与灰色的条带分开。购买与通常使用凝胶相同尺寸的胶片、片夹和增感屏。

膜对胶片的曝光

材料

- 胶片（有好多种，多数工作都可以使用）
- 片夹，通常是坚固的金属夹，硬的卡片夹
- 适用于^{32}P和^{125}I的增感屏
- Whatman 3M 滤纸，其他滤纸也可以，只要它够硬而且有吸收力
- 保鲜膜
- 胶带
- 记号笔

干胶应该与膜相同处理。

胶片放在一个纸盒内的信封里，信封方向应该与纸盒相反（因此即使不正常地打开纸盒也不会使所有胶片曝光），要仔细的封口。每张胶片之间都夹着几张纸，在你取出胶片时也将纸取出并丢弃——一盒纸可能会让你误以为还有很多的胶片。

步骤

1. 膜经过最后一次洗涤，接触膜片边缘除去液滴，室温下将其边缘靠在纸巾上凉干。
2. 将膜放在一片 Whatman 滤纸上，在滤纸上写下你的名字、日期和其他相关信息。
3. 用一小块胶带将膜与滤纸在角上黏起来。
4. 用保鲜膜将膜与滤纸包裹起来，小心不要有褶皱。
5. 将膜放于片夹中，进入暗室。
6. 打开安全灯，在桌上始终用相同的方法打开片夹，从而确定其方向。在打开的片夹内，从底部放入膜与滤纸，膜面向上，然后依次是胶片、增感屏。
7. 关闭片夹，收好胶片。
8. 如果使用增感屏，就将片夹放入-60℃～-80℃的冰箱，大多数实验室有专门存放它们的地方，不要忘记片夹并不是完全屏蔽的。小心不要将片夹放在具有强烈信号的其他片夹上面，否则将弄脏你的胶片。用塑料或者石墨板放在片夹之间，如果并没有使用增感屏，那么就在室温下曝光。可以在一个抽屉、桌面或柜子里操作。
9. 向实验室的其他同伴询问大概的曝光时间，过度曝光并不是很大的问题，因为你可以将其他胶片用更短的时间再次曝光。避免能量低曝光时间短。曝光时间从强烈的^{32}P信号到很弱的^{3}H信号，可以从几分钟到几天。

有些胶片只有一侧有感光乳剂，那么这一侧必须与膜相对。

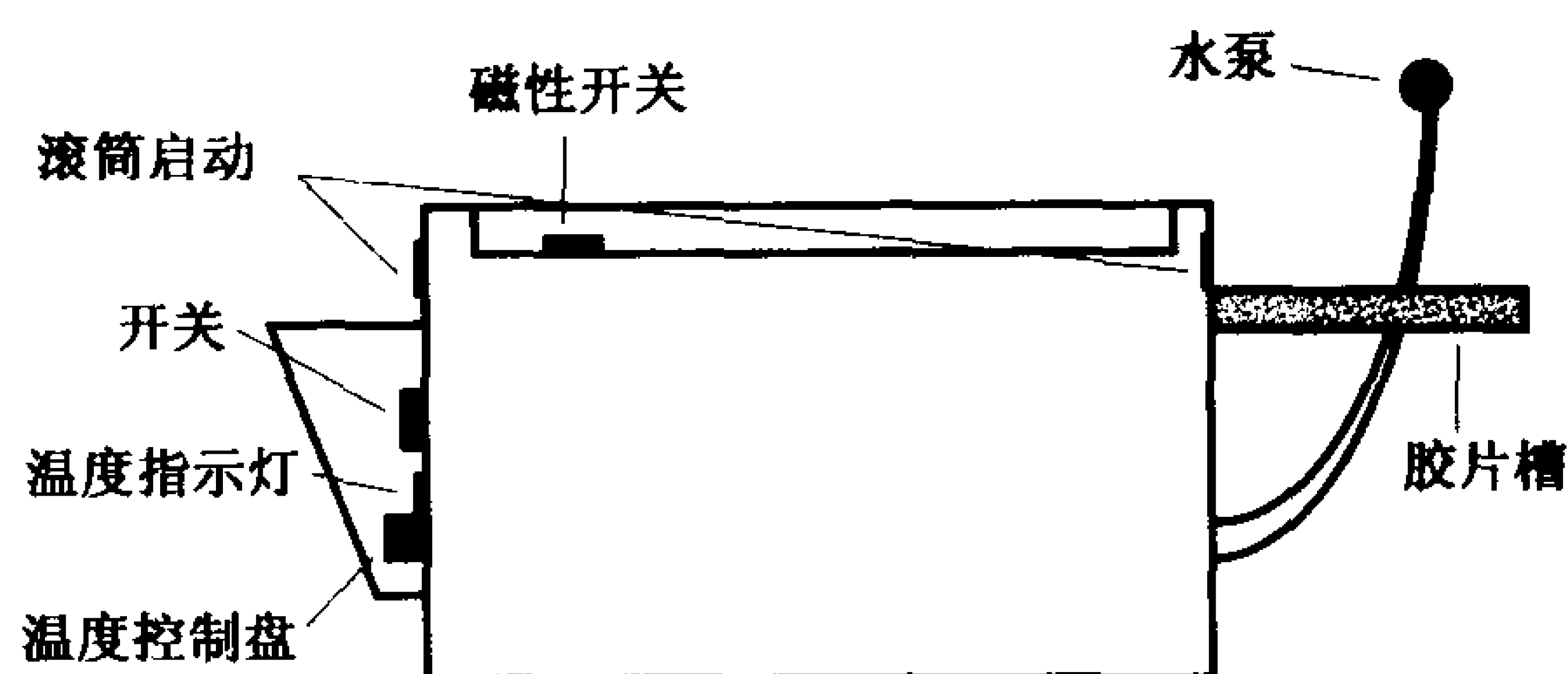


图 13-7 Kodak X-OMAT 冲洗机

使用 X 射线胶片冲洗机

1. 待洗 X 射线胶片在送进机器冲洗之前必须近乎室温，把 X 射线胶片夹从 -80℃ 冰箱中取出，升温到室温（通常要 1~2 小时）。
2. 打开水龙头。通常在靠近墙壁的地方。
3. 按下冲洗机左边的黑色开关，打开机器，工作当天第一次使用前要等待 15min，让机器升温，不要改变冲印机的温度设置。
4. 关掉可见光，打开安全灯。
5. 把 X 射线胶片从片夹中取出，放到冲印机的导入盘。片子必须干燥，温度接近室温。不要过分抖动片子以除去水汽，因为这样可能导致静电积聚其上，从而在冲洗出来的相片上留下斑点。
6. 触按机器两旁靠近上边的滚动启始按钮，机器立即发出嗡嗡声。等到嗡嗡声停止时就可以插入 X 射线胶片，机器会纳入 X 射线胶片，然后再次发出嗡嗡声，提醒你插入另一张射线胶片或者打开可见光。
7. 冲洗好的 X 射线胶片掉入机器左边的槽中。
8. 工作结束时关闭电源和水龙头。

冲洗机注意事项

- X 射线胶片冲洗机一般是公用仪器，旁边通常会有一本使用者登记簿以及一系列使用时必须遵守的特定规则。
- 有些实验室要求早晨的第一个使用者在打开机器前清洗滚动器组件。移走机器顶盖和滚动器组件盖，小心地移走滚动器组件，注意不要让滚动器上滴下来的液体污染了任何内槽。把滚动器放在热水下冲洗，然后用蒸馏水冲洗。污物常常积在滚动器边上。把过多的水抖掉，也可以用纸巾擦拭，再把滚动器装回到冲印机上。在放上顶盖之前，别忘了将滚动器组件盖放回去。
- 早晨的一项例行工作是在冲印新的 X 射线胶片之前先冲洗一张试验性片子，任何旧的片子都行。前一晚冲印机停运时积累在滚动器上的垃圾都会落在试验性片子上而不是新的 X 射线胶片上。

- 每隔一段时间冲印机会循环运行以保持湿润。如果冲印机持续发出嗡嗡声，检查顶盖以确保磁性开关位于正确位置。
- 快而尖锐的噪音意味着滚动器组件脏了并堵塞了。按上述方法清洗滚动器组件。
- 因为凝胶黏在 X 射线胶片上，或者因为它上面的滤纸被错当成 X 射线片而在无意中被送进机器中。凝胶可能会从机器中穿过，但更可能堵在滚动器当中，或者污染内槽。必须立即把它拿走，尽量避免这种情况。

☆磷屏成像放射自显影

原理 磷屏成像利用可重复使用的屏幕而不是 X 射线胶片来做放射性的凝胶和印迹分析。把储存磷光屏曝光于电离性放射源，屏上形成潜在的图像。这种图像经由激光扫描，使得屏上的 BaFBr:Eu2+晶体释放出蓝光（磷光），然后重回基态。蓝光被光学纤维束收集，导入到光学倍增管中，经数字化并测定后得到样品的定量描述。

可视化和定量 可以通过分析软件进行，软件还包括获取的编辑工具，如复制、旋转、增强图像等。

优点和缺点 所有过程都在常规光照的条件下在实验室的实验台上进行，成像比胶片自显影快 10～100 倍，曝光范围也比胶片的宽几个数量级，甚至是 DNA 测序胶也可以在多数系统中被阅读。有些系统中屏的选择可以允许你对任何同位素进行信号定量(或非放射性的化学荧光和荧光信号)。虽然设备昂贵，但实验室和系里会有这样的设备。磷成像计算机的部分软件可以对成像进行定量和处理。

如何曝光样品

1. 准备样品如同进行 X 射线胶片放射自显影一样。不要使用增强剂或氟。
2. 把储存磷光屏放置于灯光盒上，曝露于可见光以消除信号，或遵照厂家的消迹指示。
3. 把样品放置在片夹中，磷光屏幕覆盖其上，开始曝光。对第一次曝光而言，可以试用估计 X 射线胶片所需曝光时间的十分之一。
4. 磷光屏幕面插入磷光仪。
5. 扫描与分析。

液体闪烁计数

低能量和高能量的 β 放射核苷酸可以用闪烁计数仪在液态闪烁器中检测。

原理。当 β 粒子被称为闪烁体的特殊荧光化合物吸收后，闪烁体散射出光，光脉冲被一对光电倍增管检测到。闪烁计数仪记录这微弱的光脉冲，闪光一次记录一次，通常以每分钟计数次数（CPM）为单位。

- 如果与闪烁体碰撞的实际放射性衰变百分比（也就是特定计数仪的计数效率）已知，就可以计算每分钟衰变次数（DPM）。即对已知活性的标准物计数，除以实际的值，求得计数效率。

计数效率＝标准物的净 CPM/标准物的 DPM

- ^{3}H 和 ^{14}C 的标准一般由实验室购买，存放在计数仪内部或者附近，也可以从 EHS 处

获得。半衰期短的放射性同位素标准可以通过计数各同位素的量并按照公式 1 Ci＝2.22×10^{12} dpm 计算其 DPM。为精确起见，必须使用各种同位素的半衰期表（参见供应商的产品目录），求得剩余活性。

- γ 计数器是经修改的闪烁计数仪。闪烁体是晶体，置于样品室外。γ 射线可以穿过样品管，进入荧光性晶体。^{125}I 必须用 γ 计数器计数而不用闪烁体。必要时，它可以用液闪计数仪的 ^{3}H 通道来计数。
- 不同的通道记录不同的波长，必须为每种核素设置通道。这样的话，双标样品的两种核素都可以被计数。

闪烁鸡尾酒（萤石），有机成分的混合物，有毒性（来自于所用有机溶剂的烟雾），存在废物处理问题。但是，现在市场上有多种低闪点、低毒性、可生物降解的混合物，可处理干、湿样品。应优先使用这些新品，例如 Beckman 的 Ready Safe™，Packard 的 Ultima Gold™和 ICN 的 Cytoscint™。含高盐、蛋白质、有机成分，或酸的样品可能需要其他闪烁体。

- 上下颠倒或用涡旋振荡器，把样品和闪烁体混匀。
- 使用带硬盖的 7 ml 玻璃小管，20 ml 管子只在特殊情况下使用。
- 控制装入小管中的总量。大多数计数仪不能计数超过 10^{7} CPM，而 1000～10 000 是最佳计数范围。
- 计数次数少的情况可以用较长时间来记数。数值高的样品，计数 1min 就够了，数值低的样品，计数 10 min。
- 吸收由闪烁体发出的紫外光光子（颜色淬灭）或吸收样品、闪烁体能量（化学淬灭）降低计数效率。由于淬灭因素，使得计数向低能量漂移。利用内标（加入已知 CPM 于样品管中）来确定是否存在淬灭现象，如果定量很重要，还可以确定真正的计数效率。

液闪计数管需要和其他放射性废物分开处理。

- 计数结束应把样品管从计数仪中拿走。
- 闪烁计数仪还可以用来测定化学反应产生的光。光由于直接穿透不需要加闪烁体。

^{32}P 切仑科夫计数

在对高能 β 辐射量化方面，切仑科夫计数法的效率不如液体闪烁计数法，但是耗时少，减少了与液闪计数有关的危险操作以及废物处理问题。

原理。高能 β 粒子穿过水时，导致穿行轨道上的分子发生极化，释放出光子(350～600 nm)，同时它们的能量恢复到基态（切仑科夫效应）。这可以用液闪计数仪上的 ^{3}H 通道测定。通道完全打开，以便所有可能的闪光都被计数，不需要闪烁体。

- 适用于相对计数（掺入标记对未掺入标记）。
- 效率：

^{32}P 能量谱大于 0.5 MeV 的百分比＝ 80％
切仑科夫计数法的阈值

计数效率：玻璃管　　≈50%

塑料管　　≈60%

总计数效率大约为 40%

- 淬灭：切仑科夫辐射易受光学差异影响导致样品淬灭。应小心操作，样品体积需保持一致以避免不规则计数，加入内标以检查是否存在淬灭现象。

储　存

检查随放射性标记物附送的数据记录纸，找出推荐使用的储存条件。只有经批准的地方才能储存放射性物质。

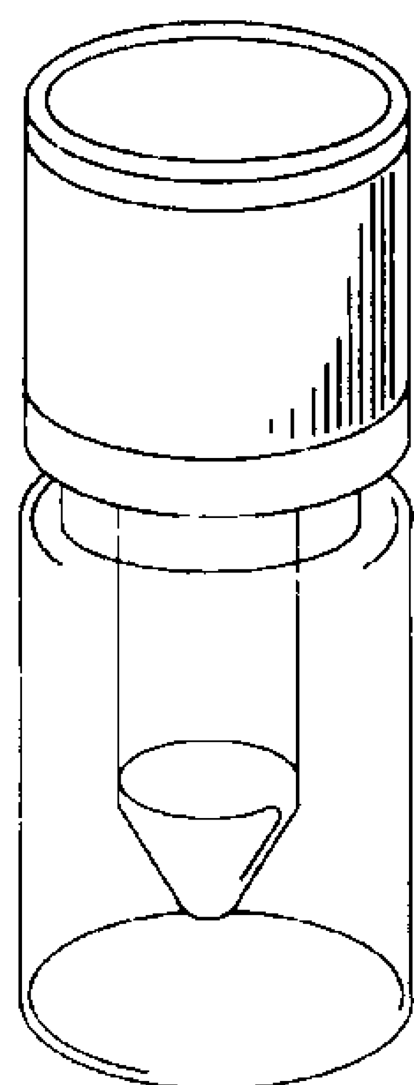


图 13-8　生产厂商的小管中溶液体积很小，有时很难看到。打开之前，轻弹小管，使盖子上的液体掉到管底

- **温度**。已标记的化合物储存在 4℃。除非数据记录纸上指明或厂家推荐，否则不要冷冻。冷冻过程中溶剂结晶，使放射性化合物发生凝聚，样品集中，加速降解。
- **分装小管**。尽量减少打开盒子的次数，因为杂质特别是氧气和水可能进去。可能会使用好几次的化合物分装所需量到不同的管子中。
- **防护**。如果化合物是装在防护盒内送来的，就储存在那个盒子中。如果不是，找一个可以防护的盒子。用检测器检测，确保样品防护良好。
- **时间**。任何已贮藏超过 6 个月的化合物应检查其纯度。如果自己不能检查，就应丢弃，重新订一管新的。

废弃处理

放射性废物必须仔细分类，以便长期储存和安全处置。个人安全与环境安全均有赖于放射性废物的安全处置。

如何处置放射性废物要考虑许多因素，而环境健康与安全部门与院系安全官员对此早已有所准备。下面所列有关处理放射性废物的指导原则可能与你所在单位的有所不同。

实验室的一个区域将被专门用于处理放射性物质。废物被隔离保存，直到 EHS 来取走。一般隔一段时间或者打电话请 EHS 来处理。实验室人员要负责置换装满了的废物桶、袋，测定液态废物的 pH 值，保持该区域整洁、安全。

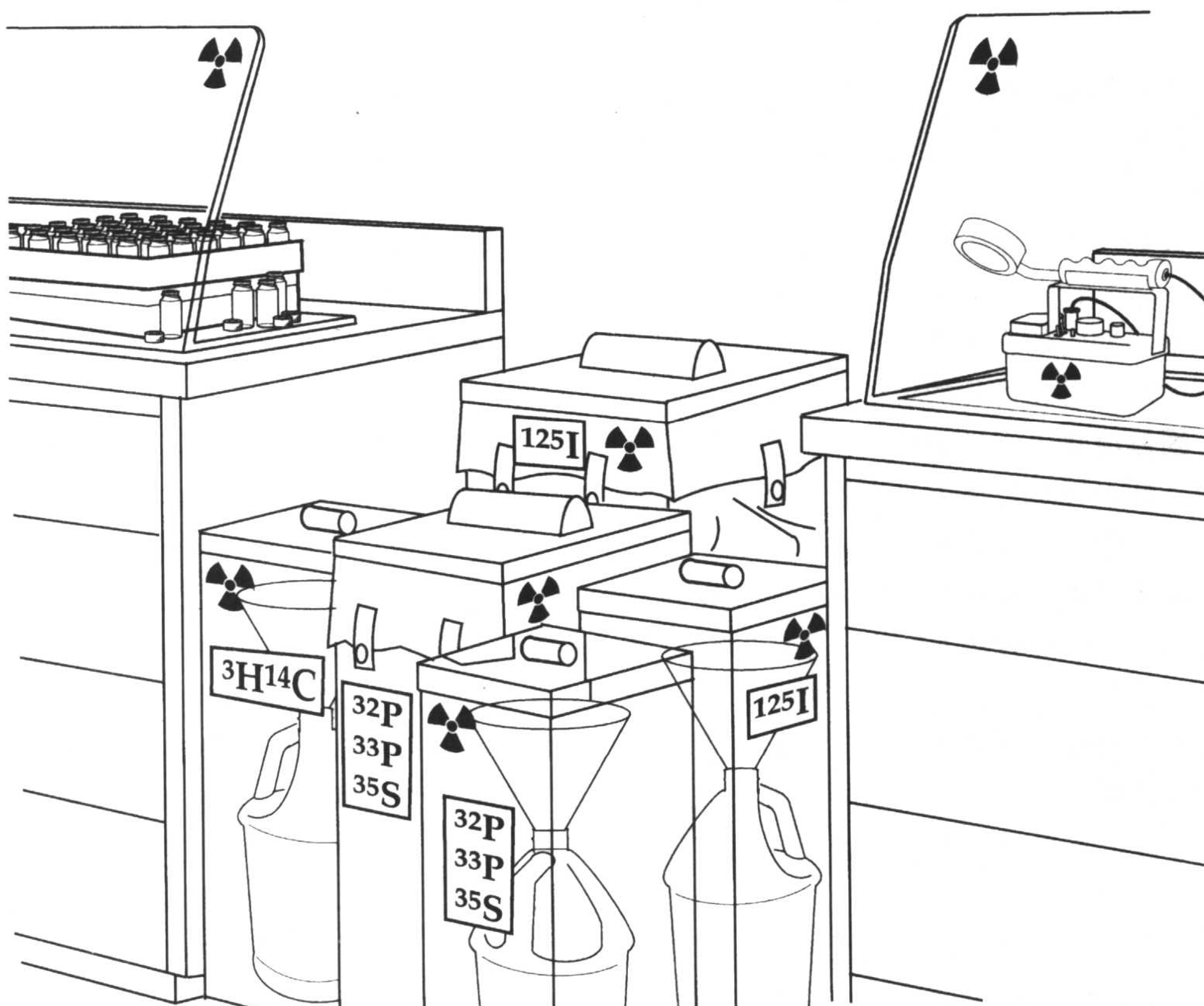


图 13-9　实验室的一个区域将被专门用于处理放射性物质

放射性物质依据同位素（长半衰期的或短半衰期的）、化学性质（水相的或有机相的）和存在状态（固态的或液态的）而隔离。生物危害性物质和液闪用管分开处理：生物危害性物质丢弃前必须灭菌，而液闪用管一般加盖装满后丢弃。

建议的处理优先顺序：

1. 生物危害性物质
2. ^{125}I 废物
3. 有半衰期的废物
4. 固态的/液态的
5. 水相的/有机相的
6. 液闪用管
7. 生产厂家的盒子

所有生物危害物质桶都必须贴上标签，每一件放射性垃圾都要计量，进来的放射性物质的量必须与出去的放射性物质的量一致。

所有的**生物危害性物质**应该消除传染性后才能当作通常意义上的放射性物质处理。液体必须加漂白粉处理，固体可以采用高压灭菌。请教 EHS 官员如何处理爆炸性样品，

通常是根据优先次序来处理。闪烁液中的生物危害性物质可能已经灭活，请教 EHS 官员吧。

^{125}I 废物经常和其他短半衰期的同位素分开放置。作为 γ 辐射源，需要和 β 辐射源有不同的防护。放射碘来源的废物需经 0.1 mol/L 硫代硫酸钠处理以结合自由的放射碘。

放射性废物总是根据半衰期不同分开放置。研究机构可以贮藏半衰期短的同位素(<90 天或 120 天，因机构而异)，直到辐射接近为零，然后按非放射性废物处理。未来长半衰期同位素的永久储存地还未可知，它们应该被无限期地安全贮藏，这是一个花费巨大而且潜在危险的做法。

固体废物丢进垃圾桶，内衬塑料袋。满了之后就要取走，贴上标签。桶内立即换上新的垃圾袋。放射性废物区应该随时有合适的废物桶。

液体废物通常用漏斗倒入一加仑塑料桶中，漏斗常留在桶上。这种做法实际有违 EHS 规定。Nalge 正推出一种盖子漏斗一体化的桶，这样桶可以保持盖紧状态。

有机废物依据 EHS 规定，倒入不同瓶中。

液闪用管分别丢置。短半衰期、半衰期的和 γ 辐射源要分开。不要丢弃松动的管子，而应该盖紧，放在另外一个盒子或桶中。

不要把铅锭丢在放射性废物中，因为铅锭通常不被污染，它们可以回收使用，也有人认为铅是有害废物，如同化学废物，咨询 EHS。

关于安全与费用之间的平衡，各研究机构的政策均不相同。有的机构鼓励人们清洗一次性的塑料制品以便丢入普通垃圾桶内，擦手纸和擦桌纸丢弃之前检测放射性，或者只把擦桌纸丢进放射性废物桶内。遵守各自规定，但千万注意安全性。

装放射性同位素的瓶子也应分别处理。通常分为短半衰期的和长半衰期的同位素，按规定处理。

所有放射性物质的处理都应记录在案，不要拖延！随时记录用掉和丢置的物品，以避免很多麻烦。

除非清除掉所有的放射性标签，否则有**放射性标签的纸盒**不会被当作普通垃圾被取走。

放射性物质的替代品

放射性物质对于生物学的发展一直是至关重要的，但是安全性的问题总是让寻找替代品的想法颇具吸引力。另外，长半衰期的同位素必须无限期贮藏的事实清楚地表明放射性物质自由而随意使用的现状将不得不受到限制。

已有适合大多数常用蛋白质与核酸检测的非放射性替代品出现，在大多数情况下，它们实际上显示出比同位素更好的灵敏性，费用还常常更低。更多地使用非放射性检测方法的主要障碍在于大多数实验室已经在仪器设备上投资了很多，它们不愿启用新技术。由于惰性和工作繁忙，人们并不总愿意尝试新的技术，一种“没坏为何要修”的哲

学在作怪。

两类主要用来取代放射性元素技术的检测法是比色法和化学发光法。

比色测定法利用酶联识别分子与合适的可溶性生色底物结合来标记分子。许多比色法依赖于链霉抗生物素或生物素的高亲和力。一级抗体（或 DNA）由生物素标记，并被交联某个酶，如交联碱性磷酸酶的链霉抗生物素识别。一旦加入碱性磷酸酶的作用底物，如溴氯吲哚磷酸/氮蓝四唑（BCIP/NBT），就会生成不溶性有色产物。产物肉眼可见，也可利用分光光度计定量。

化学发光测定法利用放射自显影采用的大多数硬件和技术。结合探针的信号是基于酶(如辣根过氧化物酶)和化学发光分子[如鲁米诺(发光氨)]之间发生的化学反应，反应发出的光可以作用到膜上被检测，就像放射性同位素一样，这种信号也可以通过成像被检测。探针可以从膜上除去而使膜被再次使用。化学发光测定法比比色测定法更加灵敏，测定中的酶可以放大信号。

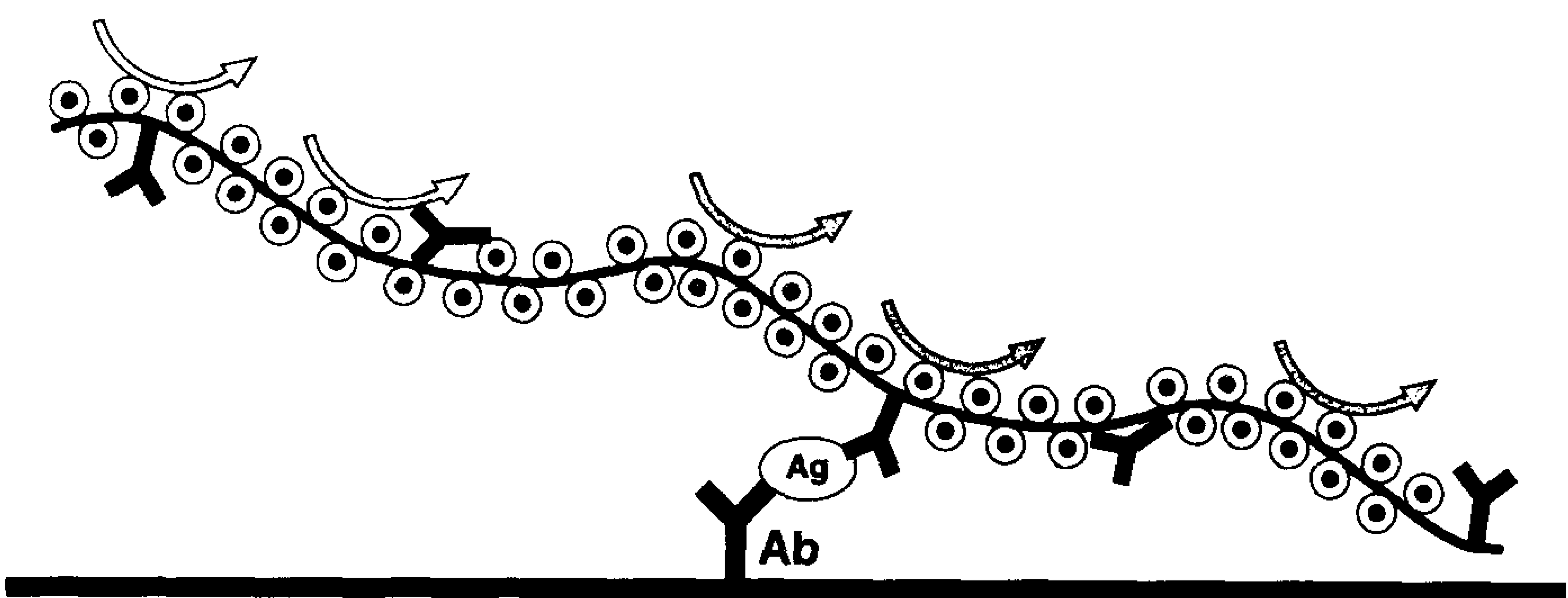


图 13-10　Amdex 高效结合：比色测定法的例子

Western 印迹的 ECL 检测法是化学发光测定法的一个例子，它利用辣根过氧化物酶催化产生光（图 13-11），转移到膜上后，该膜与一级抗体温育，不结合的抗体被洗掉，

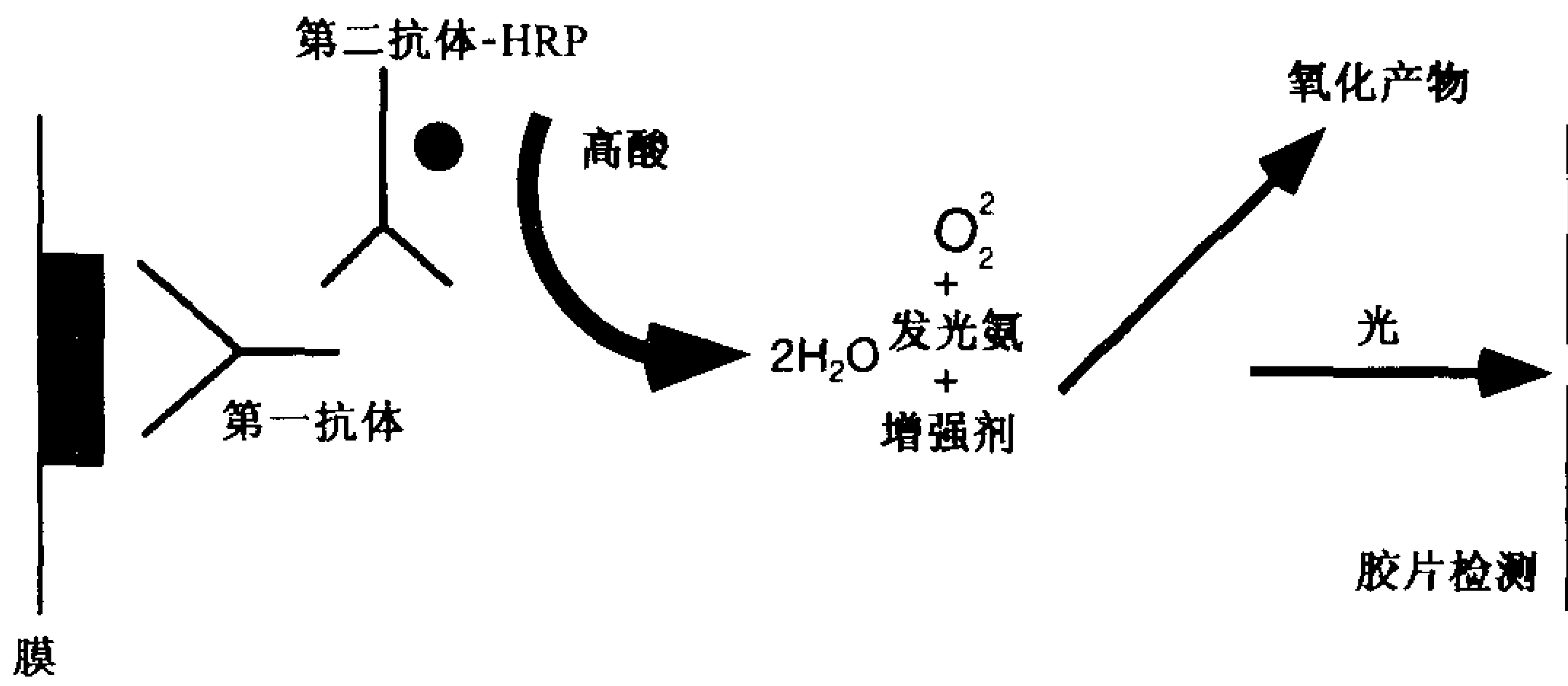


图 13-11　ECL 测定：化学发光测定系统的实例

然后已交联 HR P 的能识别一抗的二抗再与该膜一起温育，HRP 催化底物鲁米诺氧化，释放出光。这种光是化学增强的，可被记录在感光片上。整个检测过程要花几分钟，曝光时间也是几分钟，或者几秒。利用链霉抗生物素-过氧化物酶试剂，ECL 法也可以检测生物素标记的抗体。

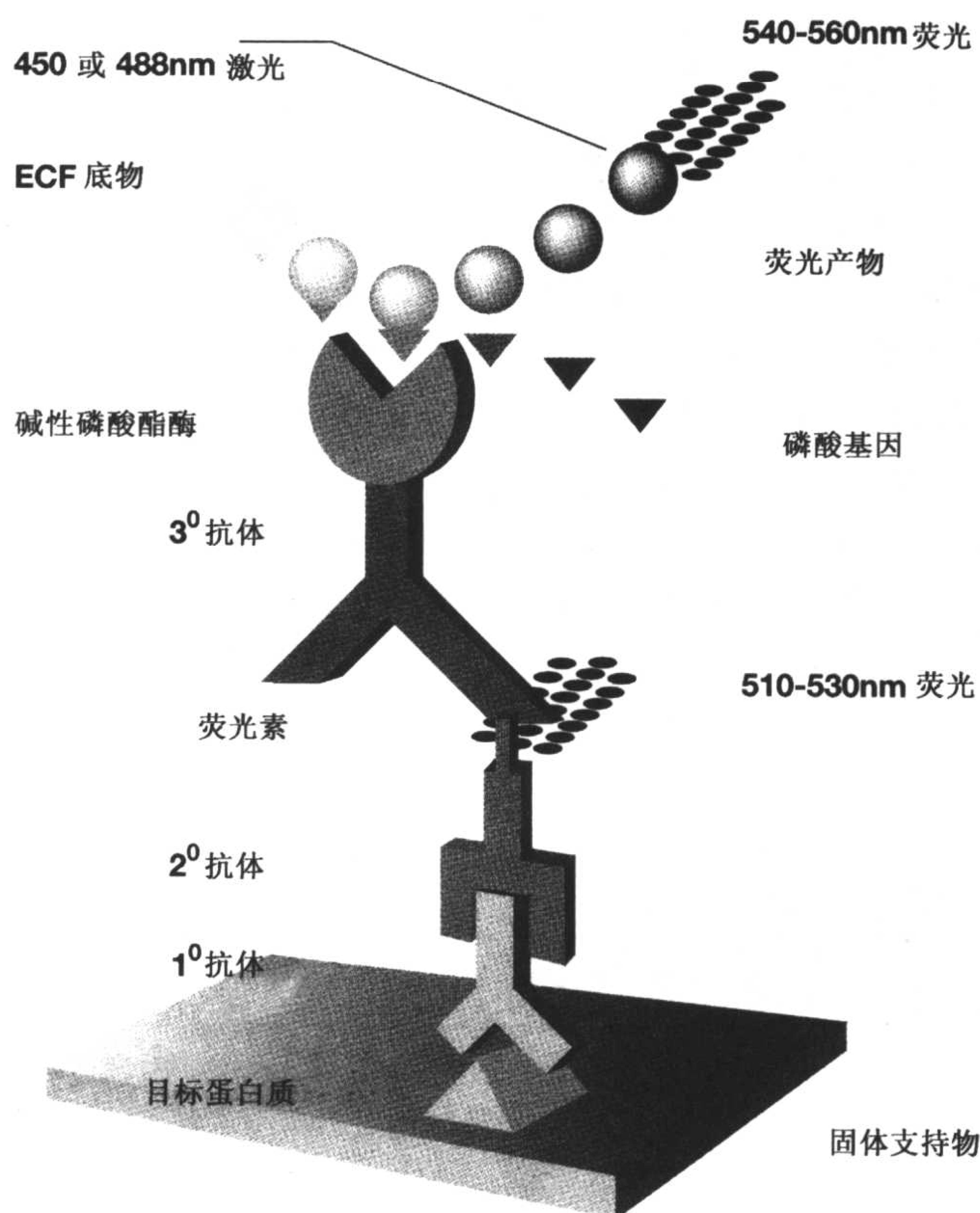


图 13-12　ECF Western 印迹试剂盒，化学荧光系统实例

荧光素标记/抗荧光素抗体和地高辛标记/抗地高辛抗体是另外的常与酶催化发光相联的体系。

化学荧光测定的原理及样品制备与化学发光测定非常相似，差别是产物的检测不同。化学荧光测定连上一个荧光分子作为第二或第三抗体，需要激光或高强度光源激发，胶片不能用于记录信号。

> 如果一级抗体是鼠源抗体，二级抗体可以是兔源的抗鼠抗体。该二抗称为 HRP 交联的兔抗鼠抗体。

化学荧光测定的一个例子是 ECF Western 印迹试剂盒（Amersham）利用荧光标记的抗鼠或抗兔二抗来识别一抗(图 13-12)。二抗可以通过荧光扫描或荧光成像设备，被记录，信号放大是必需的，通过实用抗荧光素的碱性磷酸酶连接的三抗和 ECF 试剂可以实现。碱性磷酸酶从化学荧光底物水解下磷酸基团，产生一个高荧光的产物，产物吸收 450 nm 光，发射 540～560 nm 的光。

核实生产商，特别是放射性同位素生产商，寻求可以替代放射性检测的比色或化学发光测定方法。

（李　琳　王维荣　黄伟达）

参考文献

Amersham Life Sciences, Inc. 1992. *Guide to autoradiography.* Arlington Heights, Illinois.

Amersham Life Sciences, Inc. 1996. Catalog. Arlington Heights, Illinois.

Brown T.A., ed. 1991. *Molecular biology LabFax.* Chapter 3, Radiochemicals. BIOS Scientific Publishers, Blackwell Scientific Publications. Oxford, England.

Clark D.P. and Russell L.D. 1997. *Molecular biology made simple and fun.* Cache River Press, Vienna, Illinois.

Cortese J.D. 2000. Let it shine: Fluorescence-based detection sheds light on protein function. *The Scientist* **14:** 24, Mar. 20, 2000.
http://www.the-scientist.com/yr2000/mar/profile2_000320.html

——. 2002. Beyond file: Laboratory Imagers. *The Scientist* **16:** 41, April 1, 2002.
http://www.the-scientist.com/yr2002/apr/profile1_020401.html

Gerhardt P., Murray R.G.E., Wood W.A., and Krieg N.R., eds. 1994. *Methods for cellular and molecular bacteriology,* Chapter 21, *Physical analysis.* American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Gershey E.L., Party E., and Wilkerson A. 1991. *Laboratory safety in practice: A comprehensive compliance program and safety manual.* Van Nostrand Reinhold, New York.

Haugland R.P. 2001. *Handbook of fluorescent probes and research chemicals,* 8th edition. Molecular Probes, Eugene, Oregon.

Heidcamp W.H. 1995. *Cell biology laboratory manual.* Gustavus Adolphus College, St. Peter Minnesota. Appendix H: Radioactive tracer.
http://homepages.gac.edu/~cellab/index-1.html

Holt M.S. 2003. *Appendix: Using the X-ray film processor* (Kodak M35 X-OMAT).
http://hdklab.wustl.edu/lab_manual/12/12_7.html
In *Donis-Keller Lab, Lab Manual,* posted 1995.
http://hdklab.wustl.edu/lab_manual/index.html

Howard G.C. 1993. *Methods in nonradioactive detection.* Appelton and Lange, Norwalk.

Immobilon-P Transfer membrane user guide. 2000. Millipore Corporation.
www. millipore.com

Molecular Dynamics. 1996. *Brochure 9630. PhosphorImager SI.* Sunnyvale, California.

Party E. and Gershey E.L. 1995. A review of some available radioactive and non-radioactive substitutes for use in biomedical research. *Health Phys.* **69:** 1–5.



H_2O

第14章 离　　心

哪一台离心机？什么速度？什么温度？离心机的主要用途是分离重要的生物分子。很少有实验可以在不使用离心机的情况下完成。离心机可以用来凝集提纯的蛋白质、洗涤DNA、沉淀细胞等。有各种专门的离心管、转子，以及离心机来完成不同的工作。离心机提供驱动力，而转子决定细化的离心功能。你可能会使用别人指给你的随便一台离心机，但是要知道，通过仔细选择离心机、转子和离心管，你可以让样品达到你想要达到的目的。

离心机在实验室中随处可见，这可能会让你随意对待它，但实际上它是重要而精密的仪器，使用不当会毁坏样品并造成人员伤亡。

背　　景

离心机是从溶液中分离颗粒的装置，在生物学研究实验室，这些颗粒通常是细胞、细胞器或大分子，如DNA。

离心

有两种主要的离心方法：**制备型**（用来分离某些颗粒）和**分析型**（用来了解分离颗粒的物理性质）。

分子或细胞生物学实验室中所作的决大多数离心机属于制备型离心机，而多数常规制备型离心是差速离心。

g 力和每分钟旋转次数（rpm）是大略的值：取决于所用的离心机型号和转子。

☆ **差速离心（沉淀）**

理论：样品在一定速度下离心，分成上清部分与沉淀部分。样品根据沉降速度不同得到分离。在一定离心力下，沉降速度与颗粒大小、颗粒与液体的密度差成比例。

缺点：沉淀块是沉降下来的所有成分的混合，而有些成分并不是你想要的。

所用转子：角式转子、外摆桶式转子。

例子：从培养基中沉淀细菌或细胞，收集沉淀的DNA。

☆ **密度梯度离心**

- **速率区带离心**

理论：分离浮力密度相近但形状或大小不同的颗粒。样品铺陈在蔗糖梯度或其他黏性介质梯度的顶上。

由于颗粒的密度大于液体密度，所以颗粒物质最终都会沉降下来。因此，应在颗粒已经分开而在所有颗粒到达管底之前就停止离心。

所用转子：外摆桶式或者专门设计的区带转子/离心机。

例子：用 15%～40%（W/V）蔗糖梯度分离核糖体亚基。

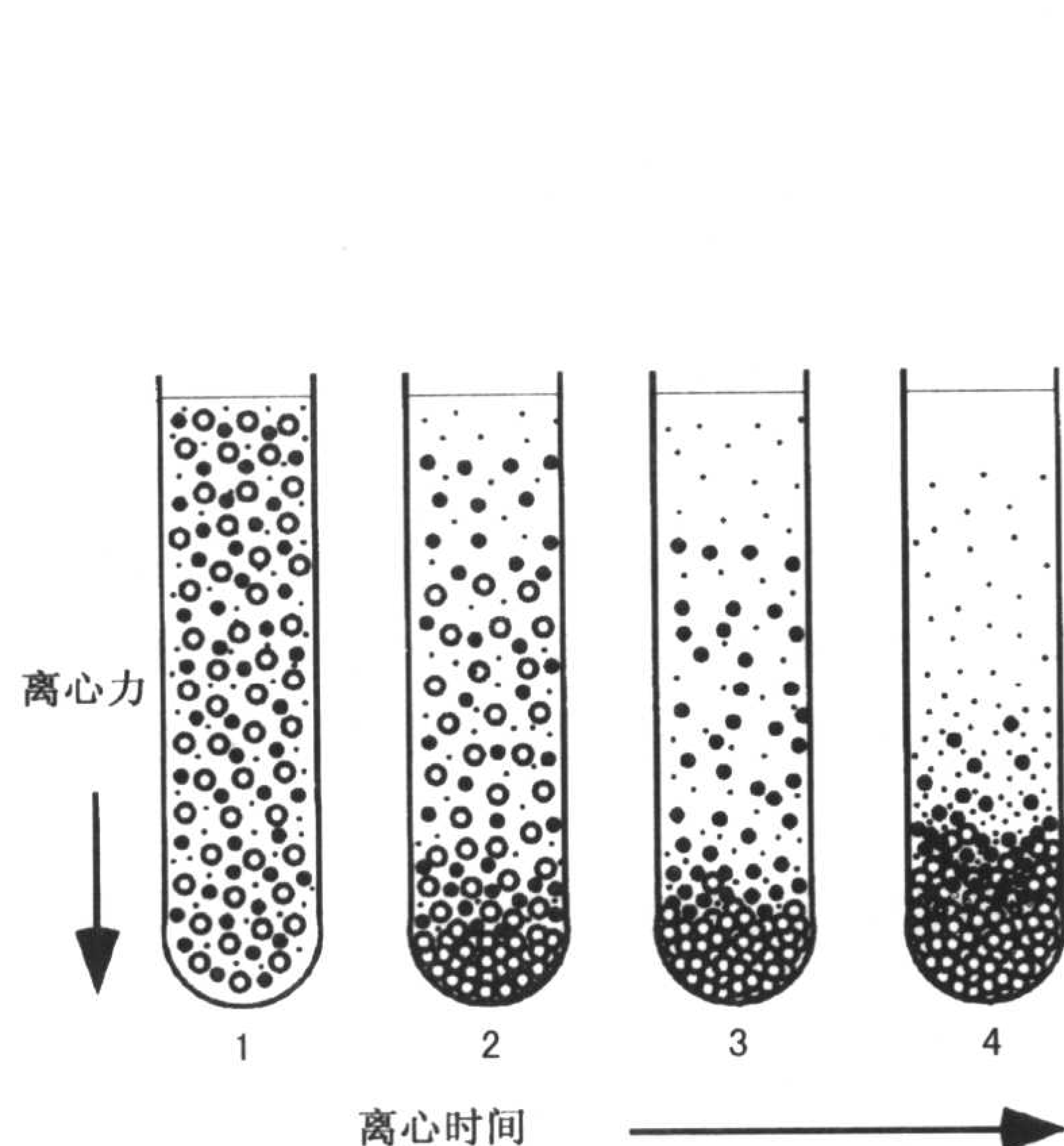


图 14-1　差速离心（沉淀）

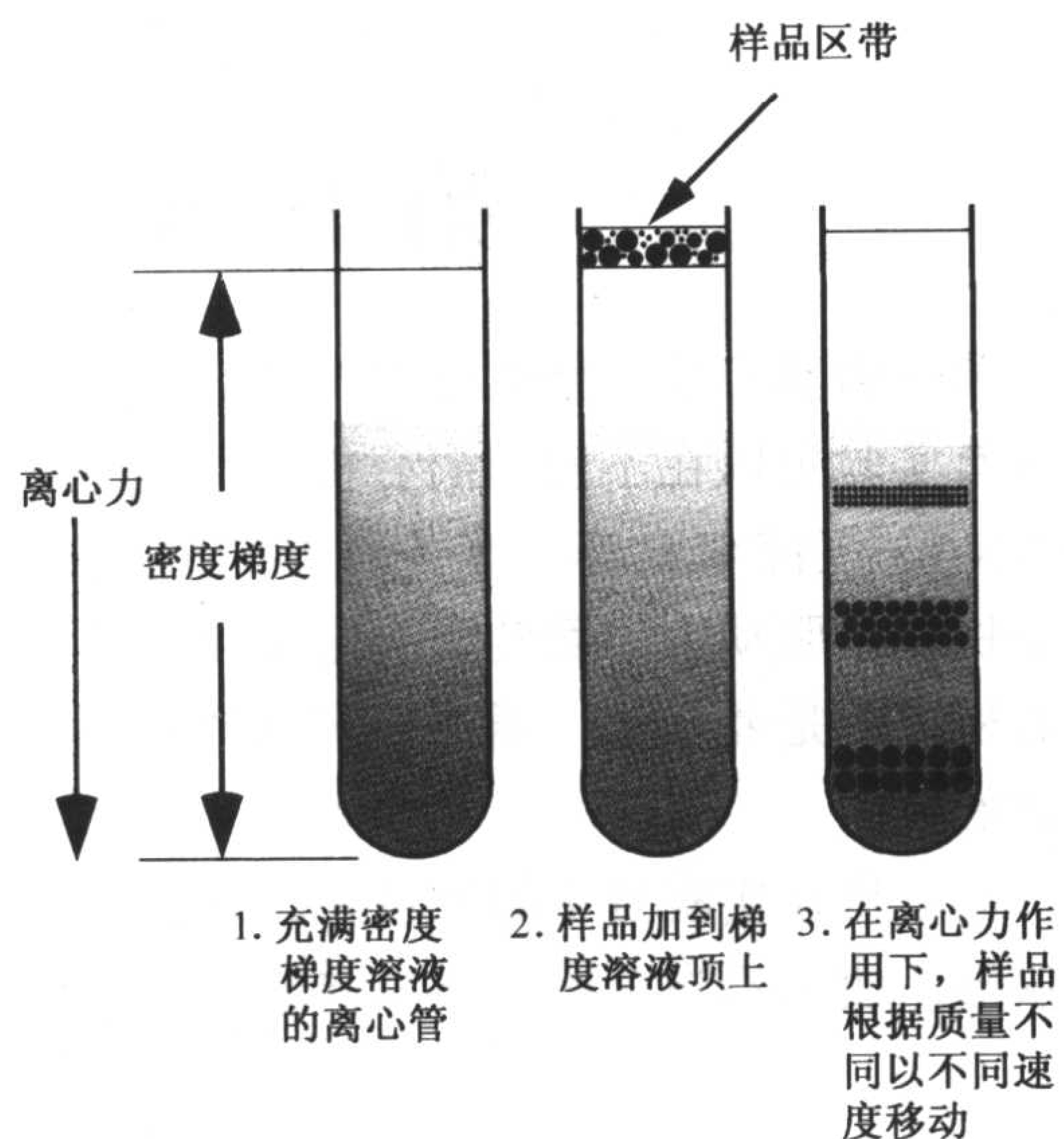


图 14-2　在外摆式转子中的差速区带分离

（Griffith 1986，Beckman Instruments.）

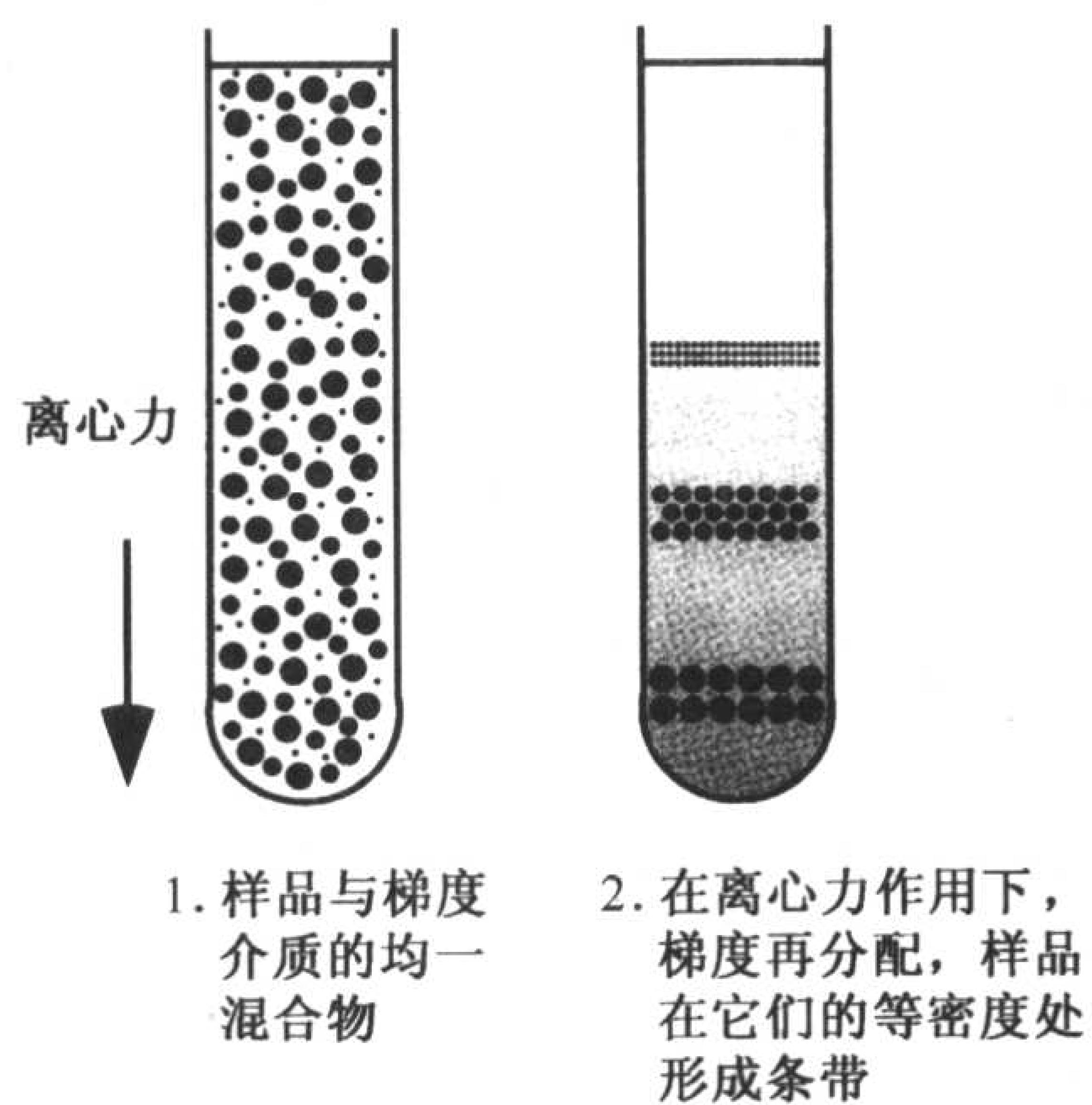


图 14-3　用自形成的梯度进行等密度分离

（经允许重画，Griffith 1986，Beckman Instruments.）

- **等密度梯度离心**

理论：如同平衡密度梯度离心一样，利用浮力密度来分离颗粒分子。样品与梯度介质例如氯化铯一起混匀，产生一个与颗粒平均密度相当的密度。然后离心这一均质性悬浮液，在离心过程中形成梯度。（氯化铯略带黏性，较难用来作预制梯度。）颗粒移动到相应的浮力密度处，停止沉降。

所用转子：外摆桶式、直立式、角式。角式与直立式为优，因为沉降距离较短，离心时间可以缩短。对于亚细胞颗粒而言，100 000～200 000*g* 条件下需要 18～72 小时。

例子：用氯化铯梯度分离质粒 DNA。

- **平衡密度梯度离心**

理论：利用浮力密度而不是沉降速度来分离颗粒。平衡密度梯度离心采用预形成梯度而不是离心过程中自我形成的梯度，实际上是等密度梯度离心的变异形式。样品在一个密度比细胞或颗粒密度为高的介质密度梯度中离心，直到形成平衡。平衡时，任一颗粒在密度梯度中移动到其密度与周围溶液的密度恰好相当的点上。

所用转子：外摆式、角式、直立式。

例子：在 Ficoll 梯度上分离白细胞。

离心机

有很多关于离心机类型的描述性术语，但那些不是严格的定义，而且离心机可以归入的类别。在实验室中，离心机通常以制造者的名字相称。

高速与超速离心机都带有冷冻装置，之所以需要冷冻是因为高速离心会产生热。其他离心机有带或不带冷冻装置的型号。

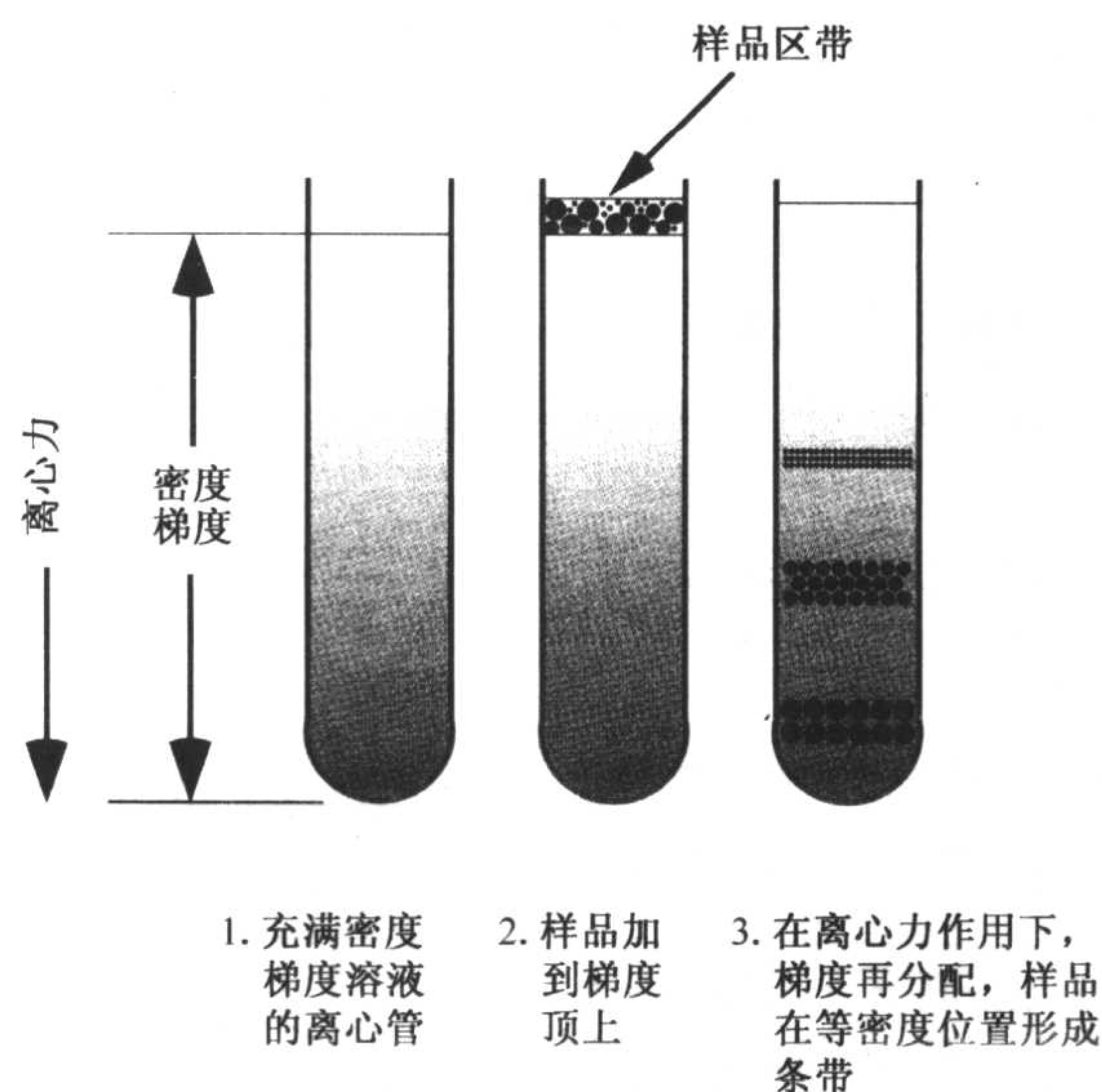


图 14-4　平衡密度梯度

（经允许重画，Griffith 1986，Beckman Instruments.）

- **台式离心机**，也称为多用途离心机。不一定放在实验台上，反而经常放在桌子底下。

  用途：沉淀细胞与细菌、酚抽提。

  g 值与每分钟旋转次数：角式 17 000g/14 000 rpm；外摆式 3800g/4800rpm。

  转子：角式、外摆式、平板。

  离心管容量：2.0 ml～180 ml。

- **医用离心机**

  用途：血清、尿样、细胞以及血液的沉降。

  g 值与每分钟旋转次数：4600g/6000 rpm。

  转子：角式、外摆式。

  离心管：各类玻璃管子，血球比容不大于 75 ml。

- **微型离心机**

  用途：微量酚抽提与乙醇沉淀、低速离心细胞收集。

  g 值与每分钟旋转次数：角式 16 000g/13 000rpm；水平角 13 000g。

  转子：角式，极少情况下外摆式。

  离心管：Eppendorf 管，0.5 ml～2.0 ml。

- **高速离心机**，也称为高效离心机

  用途：大体积的乙醇沉淀、沉淀收集细菌、离心小柱子、蛋白质沉淀

  g 值与每分钟旋转次数：新型号可以达到 75 000 g。

  转子：角式，外摆式。

  离心管：Polyallomer 管、Pyrex 管。

- **超速离心机**

  用途：病毒的浓缩、膜与亚细胞组分的分离、DNA 与 RNA 的分离。

  g 值与每分钟旋转次数：800 000g/100 000 rpm

  转子：角式，外摆式。

  离心管：硝酸纤维素管、Polyallomer 管。

- **台式超速离心机**

  用途：膜制备、病毒分离、亚细胞分级分离。30 min 氯化铯质粒 DNA 分离。

  g 值与每分钟旋转次数：625 000g/12 000 rpm

  转子：角式、外摆式。

  离心管：硝酸纤维素管、Polyallomer 管

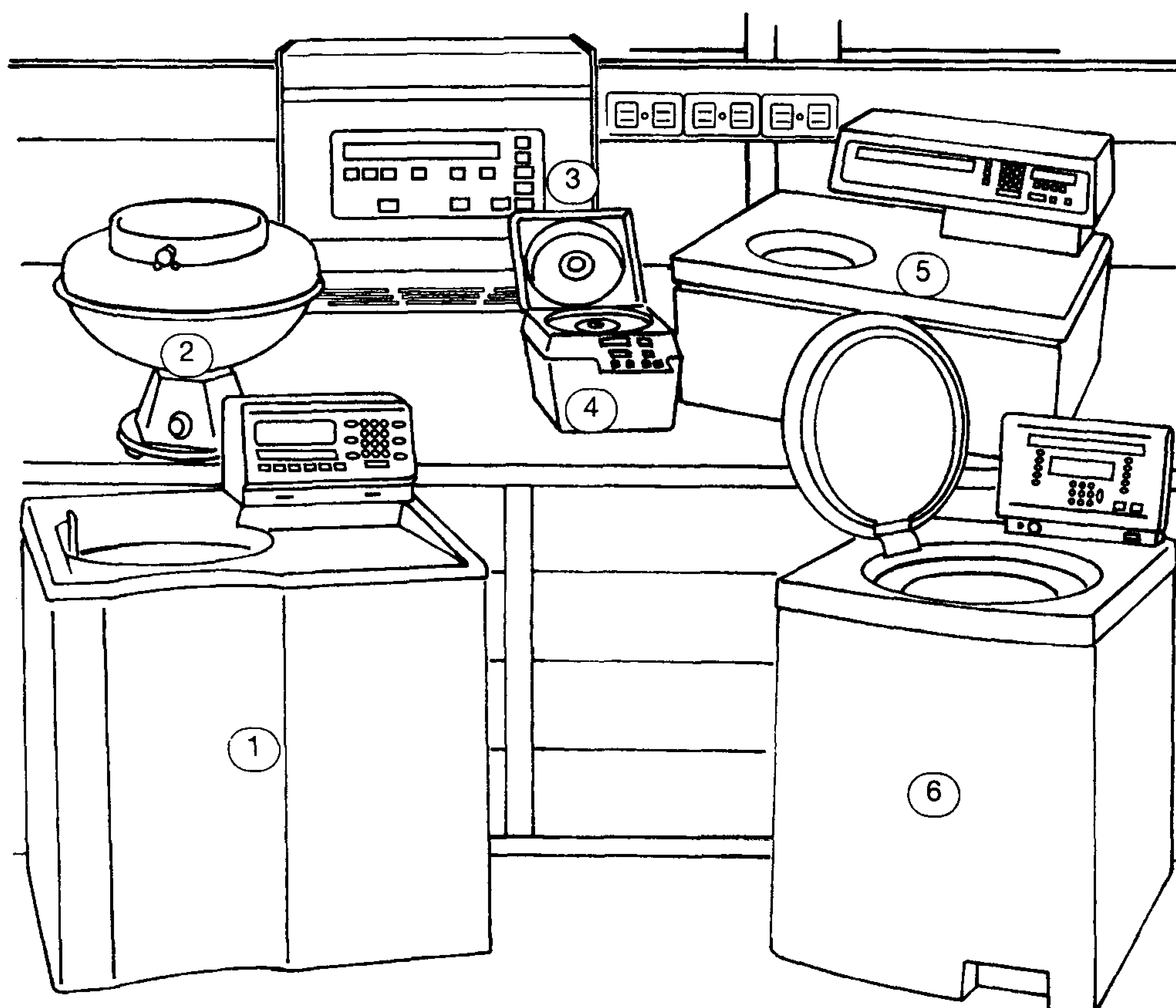


图 14-5　常见离心机

①超速离心机；②小离心机；③台式离心机；④高速离心机；⑤医用离心机；⑥通用离心机。

转子

转子主要有 4 种类型：角式、外摆式、连续流式以及区带式。只有角式与外摆式转子是标准的实验室仪器，另外两种只用作专门用途。

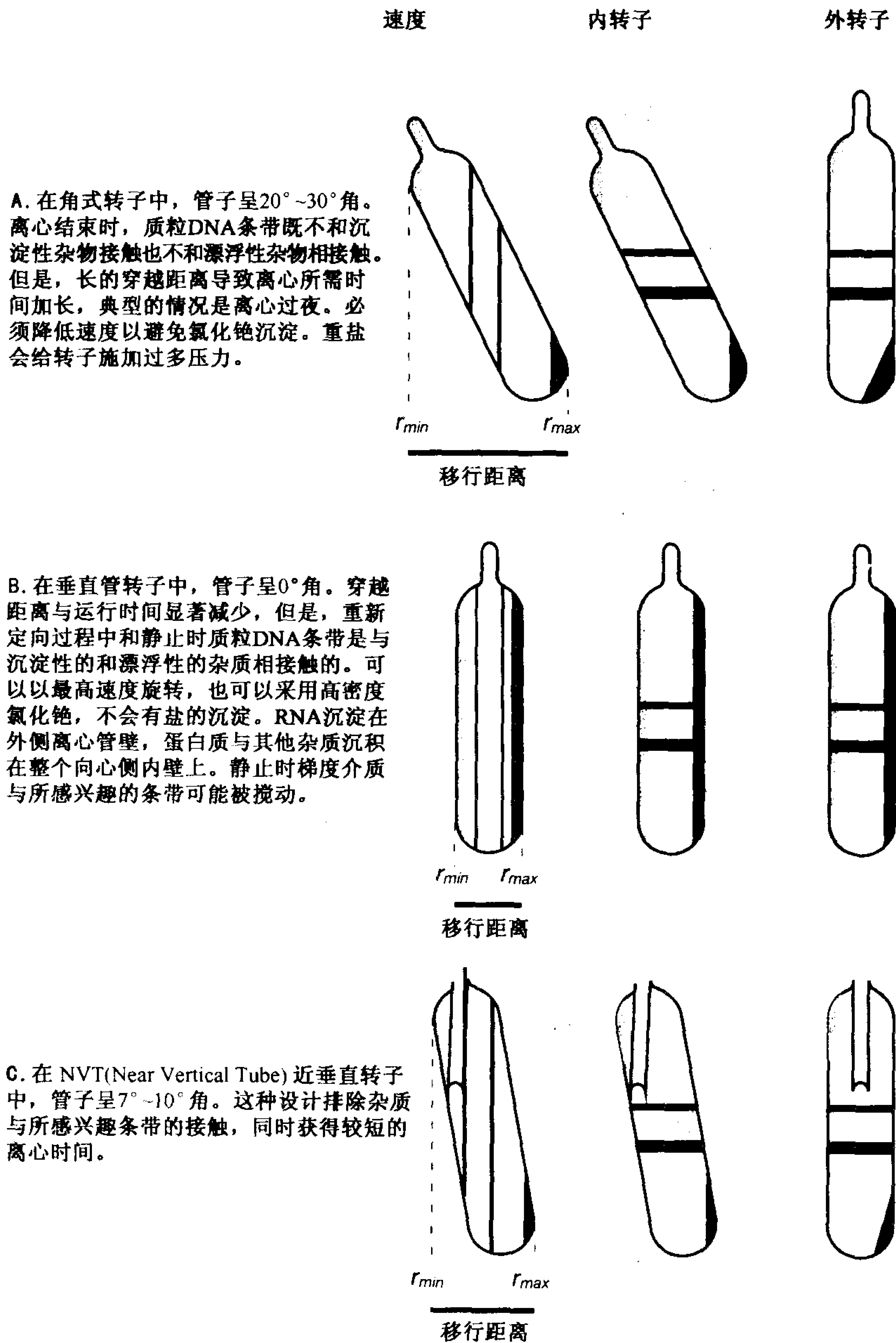


图 14-6 氯化铯密度梯度法质粒制备中各成分离心后在三种转子类型中的相对位置

近垂直转子（C）式是梯度离心的最佳选择。黑色区域代表沉淀下来的物质，灰色阴影区是漂浮性成分，而黑色线条表示条带（经允许重画，Beckman Instruments.）

☆ **角式转子**

用途：样品浓缩。实验室中的“苦力”。

说明：样品沿着与旋转平面成一定角度的方向离心。

优点：离心见效最快。物质具有更高的相对离心力，比在外摆式转子中沉降快。机器的活动组件少，损坏机会小。

缺点：物质被驱向离心管的管壁方向，然后沿管壁滑落，导致颗粒与管壁的摩擦。

例子：Sorvall SS-34 或 Beckman JA-20、近垂直转子（Beckman)、高速离心的垂直转子。

☆ **外摆式转子（也称为水平转子）**

用途：材料分离。常在临床医疗中用来分离各种细胞。

说明：样品将从旋转枢纽上甩向旋转平面。

优点：材料必须经过离心管的整个长度，而且穿过管中通常呈黏性的介质。这对样品来说比较温和，而且可以保持梯度与分层。转子中的外摆桶可以更换，这样就可以采用不同大小与形状的离心管，不易导致气雾。

缺点：更长表观离心力，沉淀要求的时间比角式转子要求的长。有很多活动部件。用久后更易损坏。

例子：SW55Ti (Backman)。

☆ **连续流式转子**

用途：在大容量液体中分离颗粒与细胞。例如，沉淀几升的细菌及单克隆抗体的制备。

说明：设计用于大容量的分离，带有进样口与出样口。

随着样品液体缓慢而连续地加入离心机，管内的沉淀块逐渐增大。不同体系每小时可以处理 10～100 L 不等。

优点：可以处理的体积大。

缺点：离心机必须配以进样口和出样口；清理与保养耗费时间；许多部件容易遗失或损坏；产生气雾。

例子：Sharples™（用于奶酪的分离），Avanti J 系列（Beckman)。

☆ **区带转子**

用途：密度梯度上大规模分离颗粒，可以分离液体、细胞或组织样品。

说明：细胞悬液与梯度介质可以用泵从专门的入口打进转子里面，速度可调，以选择性排出密度不同的细胞。

优点：可处理的体积大。

缺点：需一定技巧。

例子：离心淘析器、CF-32Ti (Beckman)。

工作规则

- 不可在任意离心机上进行放射性、生物危害性或传染性物质离心，除非你检查并确认使用的是合适的经指定的专用离心机。

- 平衡所有的离心管、离心管载具、帽子及顶盖、护罩和管套等。不是仅仅平衡离心管，而要平衡整套的活动部件。小心不要混淆配套的管套、护罩以及适配器，管套与护罩通常都标有重量。平衡管内必须用与要离心的材料相似的材料来填充，例如，从培养基中离心细菌，可以用水平衡，但不可以用来平衡氯化铯。

不是每一个人在离心生物危害性材料时都会非常小心，所以转子及离心机内部可能会被污染。在装入及清洁离心机时需要戴手套。

- 如果有登记簿，要仔细地登记必要的信息，这些信息对于追踪转子的使用情况是必要的，因为许多高速或超速离心转子在达到一定的小时数后将不可再用额定转速（以不能在最高转速下安全运行来判断）。

如果制造商没有在管套、护罩和管子上面刻上其重量，用漆或有色记号笔标记配套的一对。

- 每一次使用任何离心机，包括小型离心机之后，都要清理干净。擦拭离心机内部。把外摆式桶从转子上取下，用蒸馏水冲洗，干燥，倒置。把整个角式转子冲洗干净。
- 必须清楚每一台离心机及转子的速度限制，不要超过限制。记住外摆式转子不可能像角式转子那样快，不要想当然。如果运行时离心机声响沉闷烦人，有可能已经超过了推荐使用的速度。
- 使用合适的转子及转子载具。这对于高速离心尤其重要，因那时有更多的压力作用在转子上。离心管在载具或转子内既不能太紧也不能太松。许多管子及管子载具需要适配器。
- 盖上盖子。使用专用盖子或者用 Parafilm 包紧。不要使用铝箔纸，因为离心时会脱离、破裂，也不能包裹住气雾。
- 离心管不要装满，留出 1～2 cm。装得太满的话，即使可旋盖的离心管也会发生渗漏，装得太少，离心管可能会折塌。
- 不要使用有裂缝或其他任何隐患的离心管。立即丢弃，不要想着留下来以后低速离心时用。包裹良好的一次性离心管也要检查有无裂缝。一个有极小裂缝的离心管离心前或许可以装液体而不漏，但在离心力作用下就会破裂。
- 每次检查外摆式转子所有的桶。使用前后，打开并检查全部的桶，桶内遗留的离心管可能导致离心机不平衡。确定每一个桶就位正确，可以自由摆动。
- 只在盖紧的离心管及覆盖良好的容器内离心传染性材料。离心过程会产生气雾，即使没有明显的喷溅，传染性颗粒也可能散布。对于高毒性或致病性的材料应使用热封管。
- 别忘了转子盖。大多数角式，某些外摆式转子有配套的盖子。如果离心启动后发现盖子忘在外面，应停止离心，盖上后再启动。
- 冷冻离心机在两次运行之间应关上盖子，以避免冷凝。
- 立即从离心机内取走样品。离心结束后不要让样品长时间留在那里。沉淀可能会分散开，离心管也可能被其他需要用离心机的人移走。让超速离心机运行超过预定时间是非常不合适的。

如何离心

不管是什么样品，什么离心机，基本的步骤都一样。

离心管可装填至距顶部2cm。

1. 根据要离心材料的体积与性质选择合适的离心管，使用尽可能少的离心管。所以要找到容积尽可能接近样品体积的离心管。如果你要离心1L的细菌，如果能找到4个250 ml的瓶子，就不要用20个50 ml的离心管。选择成分与样品相适应的离心管。知道你将在什么速度下离心（见步骤2）。大多数离心管适用于低速离心，但对于高速离心管，必须特别仔细选择。

2. 选择与样品及用此样品所作的事相适应的离心机以及转子，实际上步骤1和步骤2必须同时决定。知道以多快的速度离心样品，是否应该冷冻？大多数情况下需要冷冻，因为离心过程中会产热，而热可能破坏生物样品。

转子通常放在冷库中，样品放进转子后能维持低温更好。

3. 平衡离心管。每一个离心管必须与相对位置上的同样重量的离心管一起离心。对每一个转子，每一个离心机，每一次低速离心，这一原则都适用。

如何平衡离子管：

处于转子相对位置上的离心管需要保证同样的重量。

小离心机的离心管：根据体积而不是重量来调节。每一对离心管中加入相同的体积。

超速离心机的离心管：每个管子都需称量，扣除烧杯的重量，一次称一个。

台式与高速离心机：最方便的做法是用盘式天平，找两个相等的离心管。

如果样品是无菌的，尽量用眼睛平衡，通过加70％乙醇或水到离心管与桶或适配器之间来平衡每一对离心管。

单个的离心管必须用与样品相同的介质来平衡。

4. 总是按照相同的方向把离心管放入离心机内。如果离心管是不对称的，如盖子上有一个突起，那么把每一管子按相同方式放，使突起朝内或朝外。这样，你就能知道应该上哪儿去找沉淀块。

5. 检查。确保每一个离心管都有一个位置正确的平衡管，特别是当你有很多离心管时，容易在装管的时候忘记某个平衡管。把离心管放进转子时要检查，旋紧盖子前再次检查。

缺少平衡管或放入不正确的平衡管都会造成离心机故障。

6. 给转子加盖。尽管样品一般会安全的，但还是应该每一次都加上盖子。把盖子放在靠近离心机的地方，这样不会忘记，用手指旋紧。

7. 关上离心机盖子。在大多数的离心机上，你会听到“咯嗒”一声。而且，如果盖子没有正确盖上，大多数离心机不会启动。

8. 调节离心机的设置。每一次都要检查所有的设置。

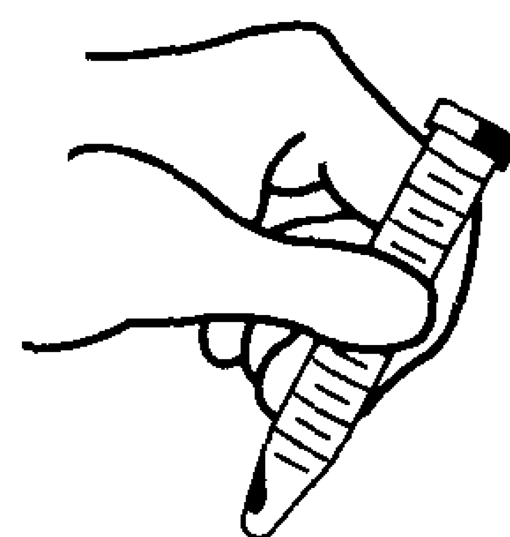
速度：调到零。如果是高速离心，以1000 rpm启动，离心机启动后缓慢调高至所需rpm。有些新型离心机在输入g值后会自动计算rpm。

温度：对细胞和细菌用低温，酚抽提则用艘温即可。

制动：通常做沉淀实验时打开，做梯度时关闭。参看实验方案。

时间：设定需要离心的时间值。实际离心时间会稍长，因为即使设定了制动，转子也不会立即停下来。

9. 总是要等到离心机达到全速后才可以走开。如果有什么问题，例如有未平衡的管子，在离心机达到全速之前该问题就会显现出来。离心机在提速时或马达到达其振动点时，出现轻微而短促的震颤是一种正常现象，不必惊慌失措。但是，如果听到巨大的“铛锵”声或者当抖动持续不停时，要立即关掉离心机。



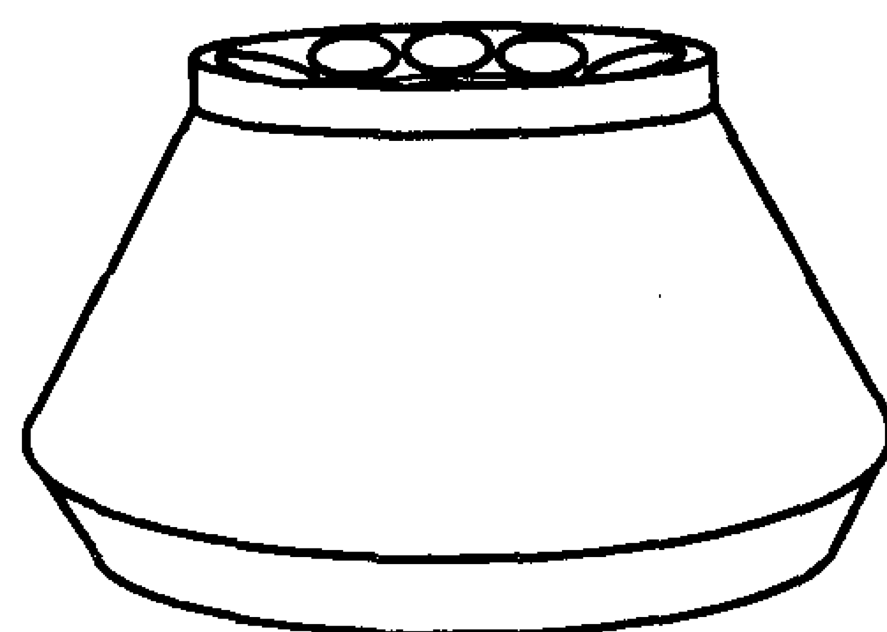


图14-7 维持离心管在离心时的角度，以避免搅动沉淀块

10. 非常缓慢而小心地移走管子，这样你不会搅动沉淀块或者条带。从转子中取离心管时，要保持离心管的角度。要注意沉淀的位置，如果你担心不能找到沉淀的话，用记号笔在管子上标注沉淀位置。预先准备好冰盒或者试管架。
11. 移去上清。可以用倾倒或抽吸的方式。
12. 清洗沉淀。（这一步并不总是需要，通常有助于提高沉淀的纯度。）向沉淀中加入半管的清洗液，盖紧，振荡，直到沉淀重新悬浮起来。如果沉淀不动，用一无菌移液头把它从管壁上挑开后继续振荡，将离心管内补满，平衡，振荡后离心。
13. 移取沉淀。吸走最后的洗涤液后，沉淀重溶于少量（2～5倍沉淀体积）的重悬液或洗涤液中，换到较小的离心管中。
14. 清理工作。清洗试管架、转子以及离心机内部。一次性离心管弃置于恰当的（一般是生物危害性的）垃圾桶内，玻璃制品浸泡（先用10%漂白粉冲洗生物危害性物质）或者洗刷。

> 尽管超速离心机的使用基本上遵从相同的步骤，但是有些其他步骤对于安全使用是必不可少的。例如，你可能需要选择加速或减速的时间，或者需要抽真空到一定程度才能达到指定速度。使用超速离心机之前先请人演示一遍。

> 不要用手去制动转子！这不仅可能造成伤害，而且可能对转轴与制动闸造成损伤。静等转子自行完全停止。

如何决定离心速度

> 大多数情况下，你所需要的离心机类型是你所能得到的。各实验室往往修改实验方案来适应离心机。离心机是昂贵仪器，通常要用到不能用为止。

为样品选择离心机时，需要什么速度是主要的考虑因素，样品体积是第二个考虑因素。

速度或者以重力（g）或者以每分钟旋转次数（rpm）表示。g力也被称为RCF，或者相对离心力，是离心时施加的。各实验方案一般以多少g来表示离心速度，是一个常数。典型的离

心速度是：哺乳动物细胞 500 g，大肠杆菌3000 g，当然这是可变的。

每分钟旋转次数 rpm 不仅依赖于离心产生的力，而且依赖于转子的类型与大小以及理想化型号。

> 在网页上查实所用离心机和转子的制造商，他们能提供一些带有测定离心速度的计算信息。

☆ **g 的计算**：运用以下公式，可以从 rpm 计算 g，也可以反过来计算。

$$g = 1.12 \times 10^{-6} \times \text{半径}\ (\text{mm}) \times \text{rpm}^2$$

> **测定半径从转子中心到管子的底部。对于角式转子，要这么做是简单的，量到空腔的中央即可。大多数的制造商提供三个半径测定值：最大半径、最小半径和平均半径，或者从旋转中心到样品管的底部、顶部和中间的距离。对大多数的使用情况而言，半径的测定无关紧要，用底部的值或者中间的值都可以。**

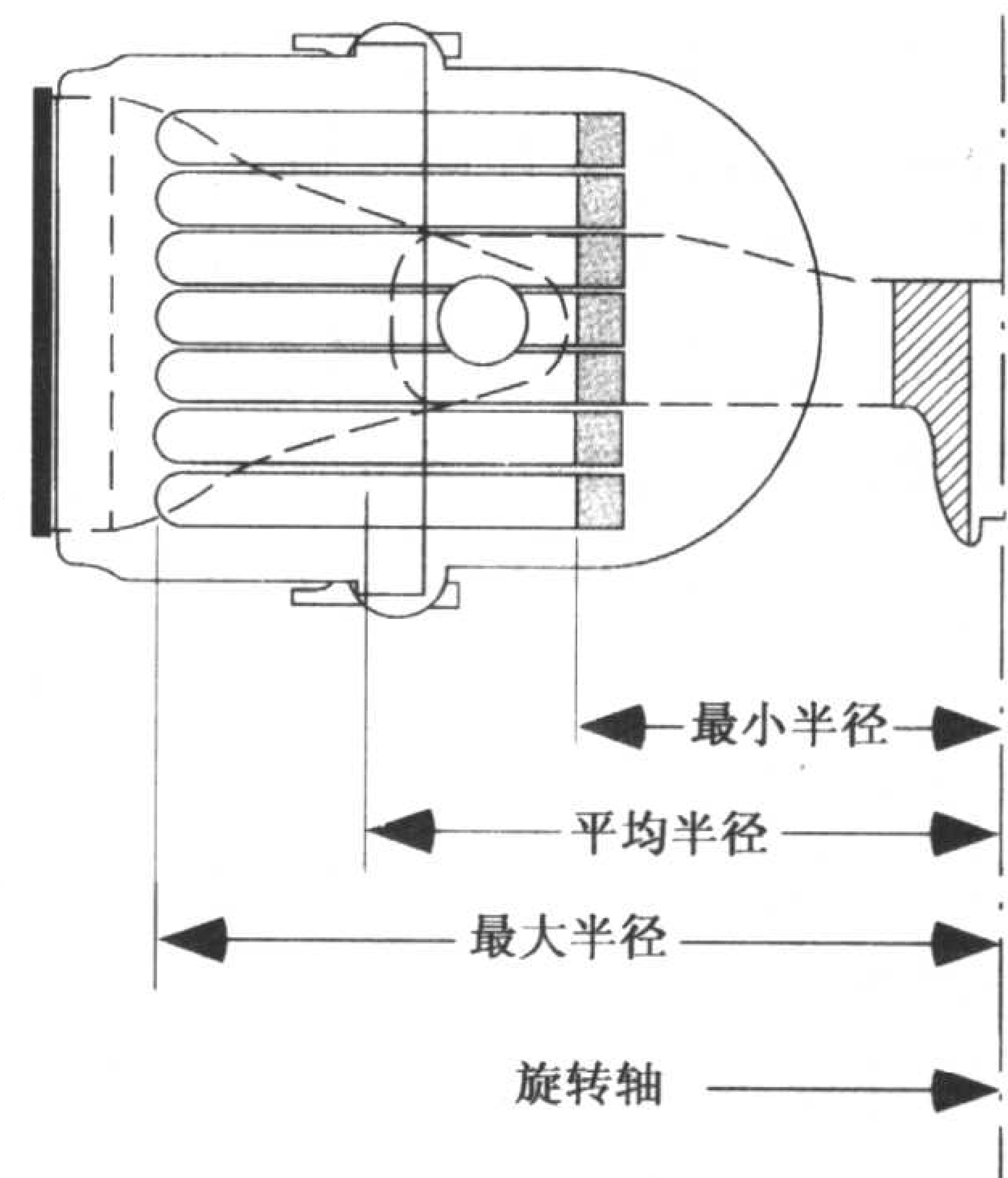


图 14-8　测定外摆式转子的半径

把管子放到类似于其在离心过程中的位置，测定从管子到转子中心的距离（经允许重画，Beckman instruments）。

半径测定也可用于在列线图上计算 rpm 值或者 g 值（图 14-9）。用尺子从半径距离值到 RCF 或者 rpm 画一条线，找到未知的 RCF 或者 rpm。

离心管

选择离心管考虑的因素

- 容积可以从几微升到几升。目标是尽可能少地使用管子。较少离心管意味着较少操作和更高的得率。
- 样品是水相还是有机相的？是否是生物危害性的？样品的组成是否会影响管子的组成及材质。

  水溶性样品在大多数塑料和玻璃制品中是没问题的，而有机相材料只有在某些塑料制品及玻璃制品中才是安全的。比如，酚抽提物，通常在玻璃或者惰性材料如聚丙烯管子中离心。

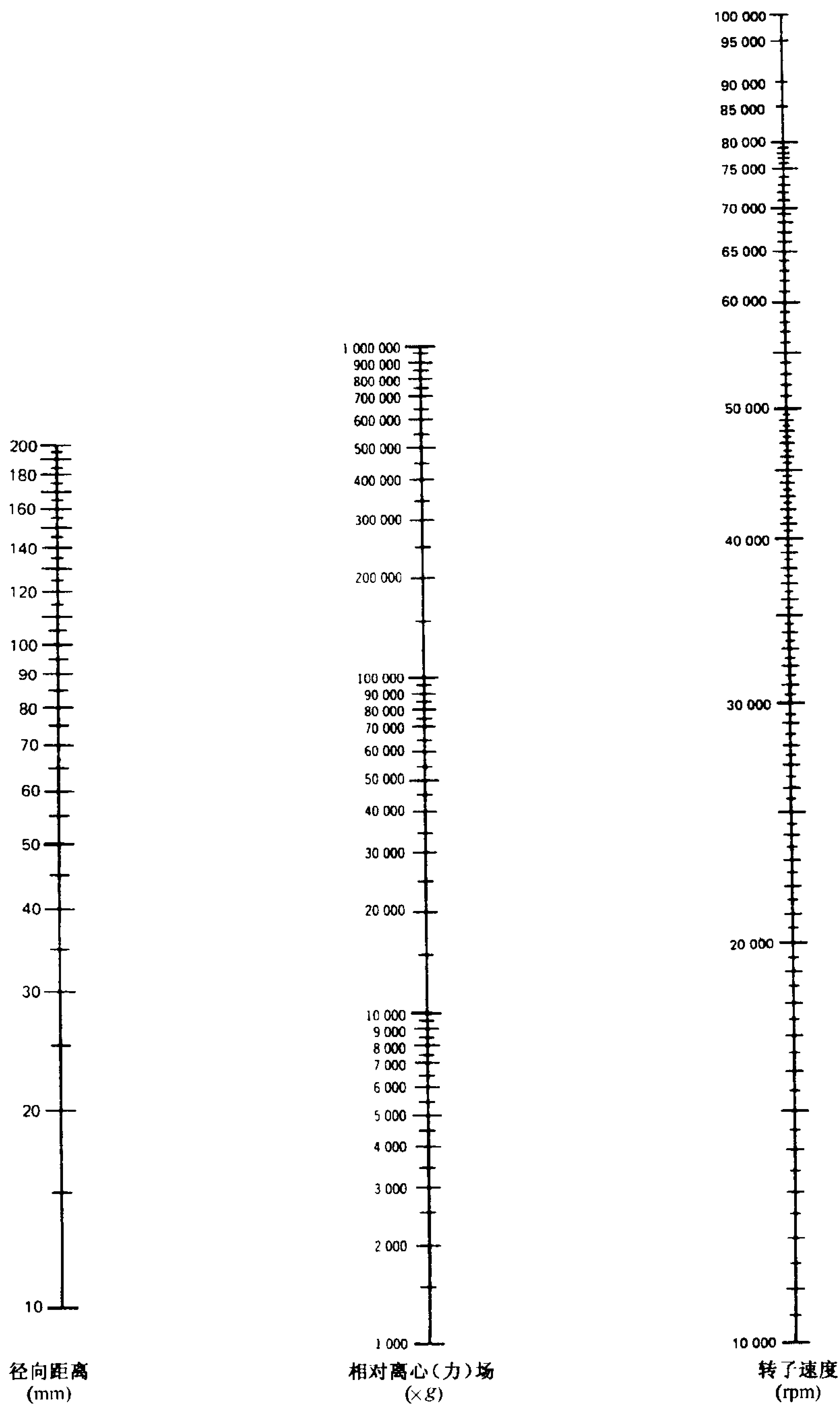


图 14-9　计算相对离心力的列线图

（经允许重画，Corning Life Science，Corning，New York）

对生物危害性材料应该采取预防措施。管子应该有可旋紧的或者卡紧的盖子，管子绝不应该长时间开口。

- 温度可以影响管子的完整性。透明的 polyallomer 和 Teflon FEP 管只有在冷冻离心机内才可以最高速 RCF 离心。对半透明聚丙烯管并不推荐使用冷冻离心。
- Corex 管（Corning 玻璃制品公司的商标）比其他普通玻璃管更硬，也更耐热，耐化学品和刮擦。它们通常被用于收集核酸沉淀。最大速度可达15 000～18 000 rpm，但超过18 000 rpm 可能破裂。

表 14-1 管子材料及其性质一览表

类型	光学性质	可割片状	可穿孔	重复使用	灭菌方法	化学耐受性[a]
超清晰	透明	是	是		只能冷灭菌但不能用酒精	除碱性的（>pH 8.0）外对各种梯度介质耐受性好。成功用于大多数弱酸及一些弱碱。不能用于 DMSO 与大多数有机溶剂，包括各类醇
薄壁						
标准管				是		
Quick-seal 管				否		
Polyallomer	半透明	是	是		各类管子可于试管架上121℃高压灭菌	对各种梯度介质包括碱性的耐受性好。成功用于大多数酸、碱、醇、DMSO 及一些有机溶剂。
薄壁						
标准管				是		
Quick-seal 管						
厚壁						
管		否	否	是		
瓶		否	否	是		
Polycarbonate	透明	否	否		推荐冷灭菌，但不能用酒精。可以121℃灭菌，但寿命缩短。	除碱性介质（>pH 9.0）外对各种梯度介质耐受性好。成功用于一些弱酸。不能用于各类碱、醇和大多数有机溶剂。
厚壁						
管				是		
瓶				是		
Polyprolene	半透明	否	否		可以121℃高压灭菌	对各种梯度介质包括碱性介质耐受性好。成功用于许多酸、碱和醇类。不能用于大多数有机溶剂。
管				是		
瓶				是		
不锈钢	不透明	否	否		可以高压灭菌，储藏前需干透。	对多种有机溶剂耐受性好，对多种梯度介质与盐类耐受性一般。不能用于大多数酸及多种碱。
管				是		
Polyethylene	半透明	否	否		可以121℃高压灭菌	对很大范围的化学试剂耐受性好。适合于强酸、碱。不能用于大多数有机溶剂。
管				是		
Corex/Pyrex	透明	否	否		可以121℃高压灭菌	对很大范围的化学试剂耐受性好。Cores 对酸碱的耐受性较好。
管				是		
瓶				是		

a 化学耐受性是通常的说法，并不意味着表达或者暗示这些推荐或耐受的安全保证。如果对于某一特定溶液有疑问，应该在实际操作条件下进行试验，评估管子材料的实际表现。不应在离心机附近摆弄高挥发性的易燃溶剂，因为可能被火花开关、继电器触点或者马达炭刷点燃。

- 不是所有管子都能耐受各种速度。对低速离心而言没有关系。但是当一个管子在超过大约5000g 时，可能在离心力作用下粉碎或者破裂。除非你确信一个管子可以在超过5000g 时离心，否则不要那样做。
- 管子有圆底或者尖底的，多数情况下都不成问题。用外摆式转子离心，沉淀将会沉积在尖底管子底部的最底部，这样较易移去上清而不搅动沉淀。如果是不宜用力离心——随之产生的沉淀更软和更易扩散细胞，这样是有利的。但是对于角式转子，沉淀可能在尖底管中散成一片，而且在管子的一侧。

如果用尖底管，你就需要一个适配器，一个与管子形状符合而大小与管架或转子内孔相同的橡胶件。有些适配器就配在管子的底部。如果没有能减少管子离心力的适配器，那么离心过程中管子可能会发生破裂。

瓶子用于大的体积，有圆底的、尖底的和平底的。应优先使用尖底瓶来收集沉淀的细菌或者细胞。另外与使用管子一样，使用尖底瓶或平底瓶时都应该用适配器。

微孔板可在微板载具上，在外摆式转子或者专为微板整改的转子中离心。载体可以架住标准大小的微板，小一点的板子则可以用适配器。

- 盖子必须盖紧以便将因旋转过程中产生的气雾对离心机内部的污染降至最低。如果没有盖子，不允许离心生物危害性材料。但是，如果没有正确清理，即使看起来无毒的东西也可能弄脏离心机而产生种种问题。

  用密封膜封盖 Corex 管子，而不是用铝箔或者棉花塞。如果有超速离心机离心管的卡口盖，最好用这样的卡口盖。

  热封管子有一个奶嘴样开口，用于高速或者超速离心危险物品。离心前管子完全封死。这些管子用于离心危害物质，如氯化铯梯度。惟一的限制是这些管子必须进行切割或者穿刺才能取出内容物，而这个过程可能很危险。

一次性管子或瓶子是否可重复使用？一般来说是的。能否高温消毒？一般来说是的。但是，并非设计用于重复使用的离心管在多次高温灭菌后终将破裂，而你不希望在一次实验中发生这种事情。如果你重复使用一次性管（瓶）子，只用两三次低速的离心，然后丢掉。

移去上清

有几种方法来移去上清，各有利弊。

- **直接倾倒上清**

  优点：快速。

  缺点：产生气雾，可能移动沉淀。
- **吸去上清**

  优点：温和，不搅动沉淀。干净，较少气雾。

  缺点：对大容积速度慢。

☆ **直接倾倒上清**

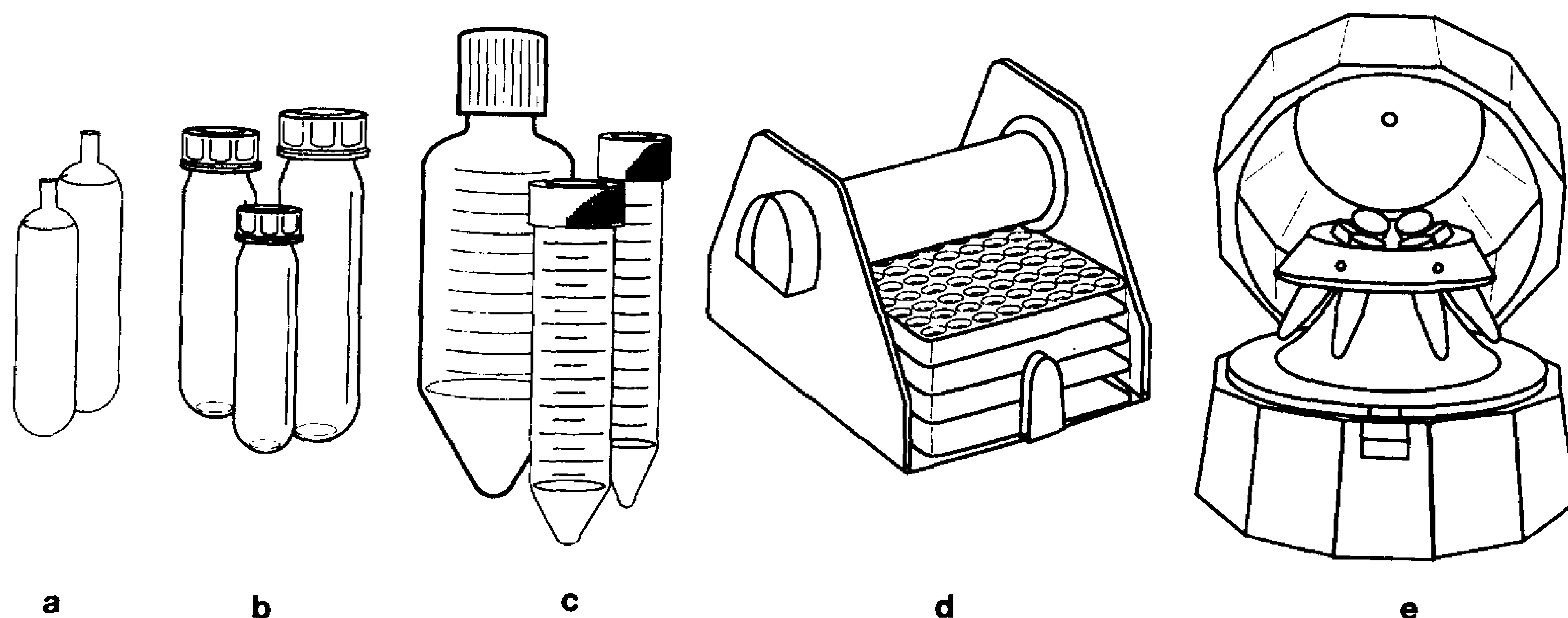


图 14-10

a. Qiuck seal 管用热封死，用于防止生物危害性材料的污染。b. Oak ridge 型管由 Polyallomer，Teflon FEP 或者 Polysulfone 制成，可以用于大体积的乙醇沉淀。c. 聚丙烯 15 ml 与 50 ml 尖底管和 250 ml 瓶子最适宜沉淀细胞。d. 微孔板转子或者载具使得微孔板在多用途离心机内可用于细胞培养、生化检测和 DNA 测序。e. 小离心机只能离心至最大速度约2000g，但是可以沉淀细胞和电泳样品。

1. 找一个锥型烧瓶用来盛放上清。如果是在离心生物危害性材料，比如细胞或者细菌的上清，先在烧瓶底部加一点漂白剂。所加漂白剂的量是你将离心并倾倒体积的 10%。

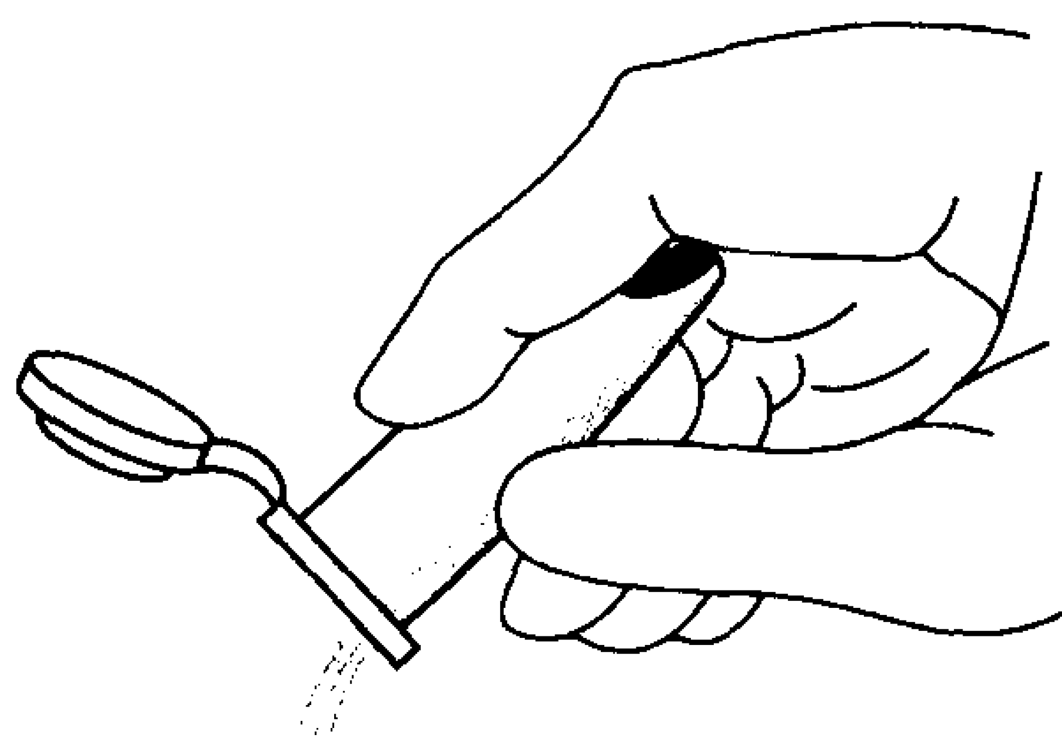


图 14-11　吸液靠近管底时避开沉淀

2. 将瓶子拿到你将工作的超净台。以什么角度将瓶子从转子中取出，就以什么角度拿着瓶子。有管架可以维持这种角度。
3. 直接倒，保持沉淀块在上面。如果沉淀牢固，一气呵成，马上加入清洗液，因为许多沉淀不应干燥。如果你看到沉淀块将要分裂，立即停止倾倒。试着吸干沉淀周围的液体。如果还需要洗涤沉淀，就不要冒着搅动沉淀的风险试图吸去全部上清，可能洗过之后运气会好一点。
4. 在将上清倒入下水道之前，使之与漂白剂温育至少 30 min。

☆ **从微孔板上倾倒上清**

整块板应快速倒置：部分倒置会导致从孔到孔的滴漏。如果细胞或者反应固定在孔的底部，可以将平板快而有力地倒置在铺于桌上的纸巾上。

> 自动微孔板洗涤仪可用来洗涤并移去所有孔中的液体。这对 ELISA 实验特别有用。

☆ **从管子和瓶子中吸去上清**（见第 9 章）

1. 将巴士德吸管连到连接管上。打开吸气器开关，调节至抽吸温和的真空度。
2. 以适当角度手持敞开的管子，沉淀处于朝上的一侧。

> 你可以在巴士德吸管的头上套上一个 100 μl 枪头来保护巴士德吸管。

3. 插入巴士德吸管，吸头尖部放在管子较低一侧，恰好低于半月型液面。

4. 随着液体的吸出，逐渐将吸头尖部移向管底，温和抽吸，以免将沉淀吸入吸管内。吸头尖部要远离沉淀。

5. 抽吸管壁，吸走全部吸附的液滴。多加练习，通过倾斜和敲动管子，你将可以抽吸每一滴液体。能尽可能多地吸走上清总是令人高兴的。

> 如果使用移液管、吸球或者移液枪，要小心，不要往上清里打入空气，那样有可能搅动沉淀。

☆ **从微型板上吸去上清**，可以通过吸液器很快地一孔一孔地吸去上清或培养基。倾斜移液头，只能碰到孔壁，不能碰到孔底。

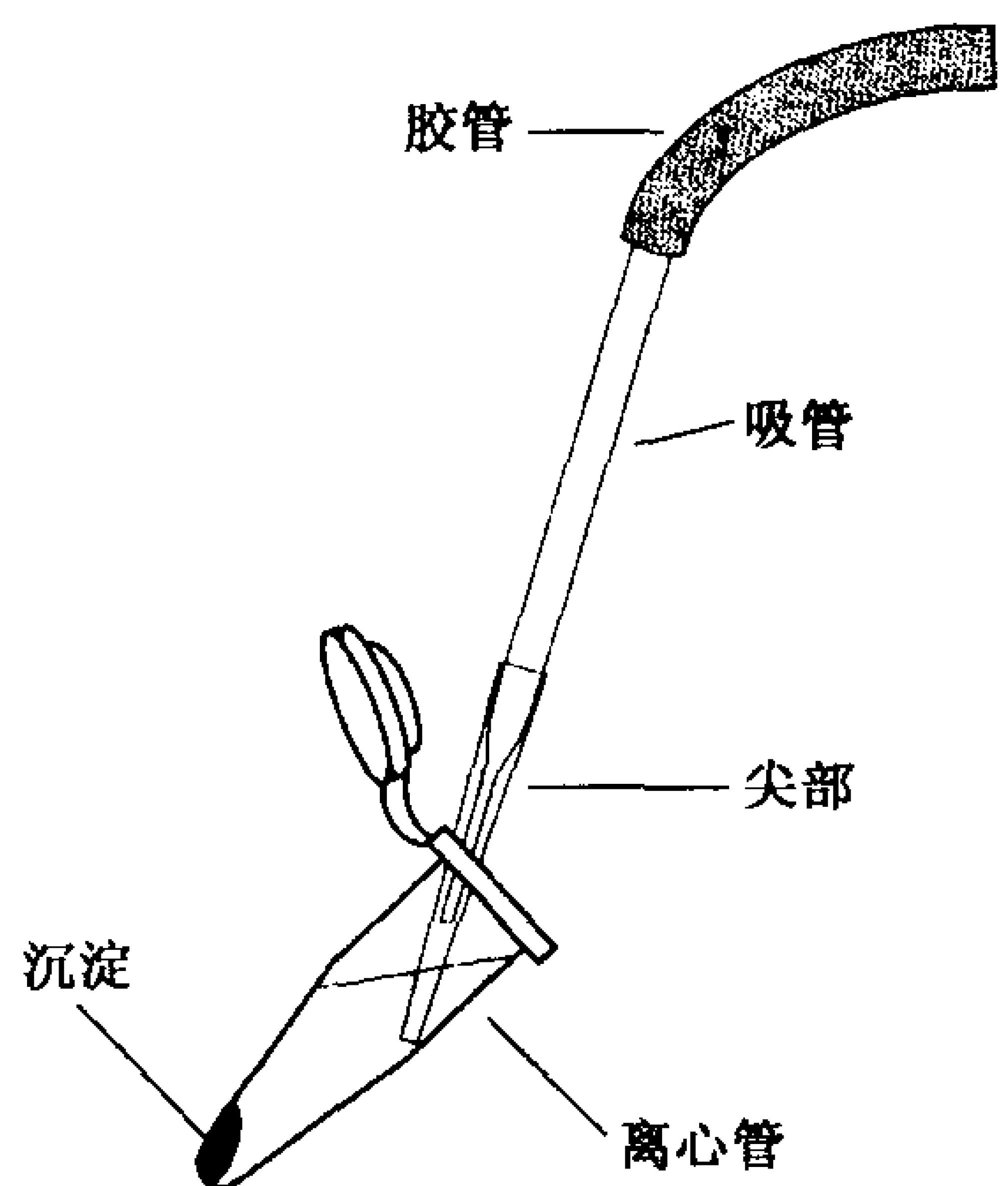


图 14-12　吸上清时避开沉淀

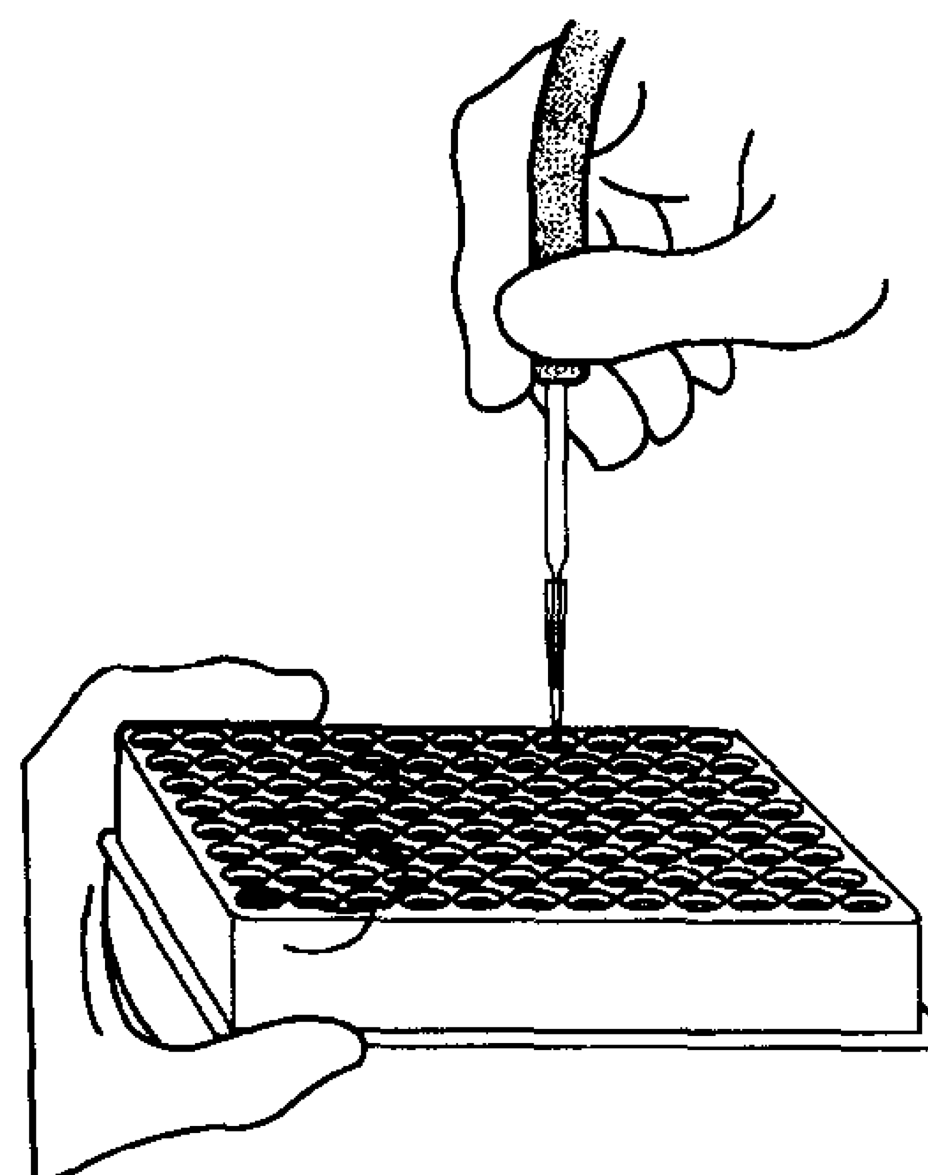


图 14-13　使微孔板倾斜向自己，呈大致 30°角。当吸液时，使吸头尖部直接向下，避免接触孔底

洗涤沉淀

- 洗涤沉淀将洗掉杂质，比如不需要的溶剂或者培养基。洗涤沉淀是一个常规操作。
- 多次洗涤有助于提高最终制品的质量。对细胞或者细菌而言，一次洗涤足够使细胞免受另一次洗涤的损伤。但是，必须考虑到细胞将要参与的用途。如果你需要细胞作酶切反应，可能洗涤两次是必须的。

> 如果沉淀块松软或要求完全干燥，可放在 SpeedVac 中真空干燥。（见第 12 章）

- 没错！在离心之前你必须使整个沉淀全部悬浮在洗涤液中。如果不是这样，洗涤不是很有效果。杂质会被包在沉淀的内部及其外部。你可能仅仅洗了沉淀外部，没做其他事情。
- 你把沉淀悬浮在洗涤液——通常是 pH 中性的缓冲液——之后，按原先用来沉淀的速度离心。但离心时间只是原先的一半。

如果没有形成沉淀或者沉淀很松软：

- 可能离心不够快或者时间不够长。
- 悬液很稠。例如，细胞在血清中离心需要比在培养基中更多的时间。
- 可能没有足够的东西被沉淀下来。

试着离心时间加长或者速度加快。尝试移走松软沉淀周围的介质，加入不那么浓稠的介质可能有所帮助，如缓冲液。但是这样效率低回收率也低，只有在保存非常珍贵的材料时才会这么做。

传染性或危害性样品的离心

离心是处理危害性材料最具风险的步骤之一，会产生气雾，而且存在管子爆裂的风险。

- 总是用有把握的管子。仔细检查裂缝或者碎片，丢掉任何看起来不是最好的管子。尽管一次性管子可以重复使用，但现在不是时候。
- 使用带盖的离心杯
- 在超净台打开转子
- 在超净台打开管子

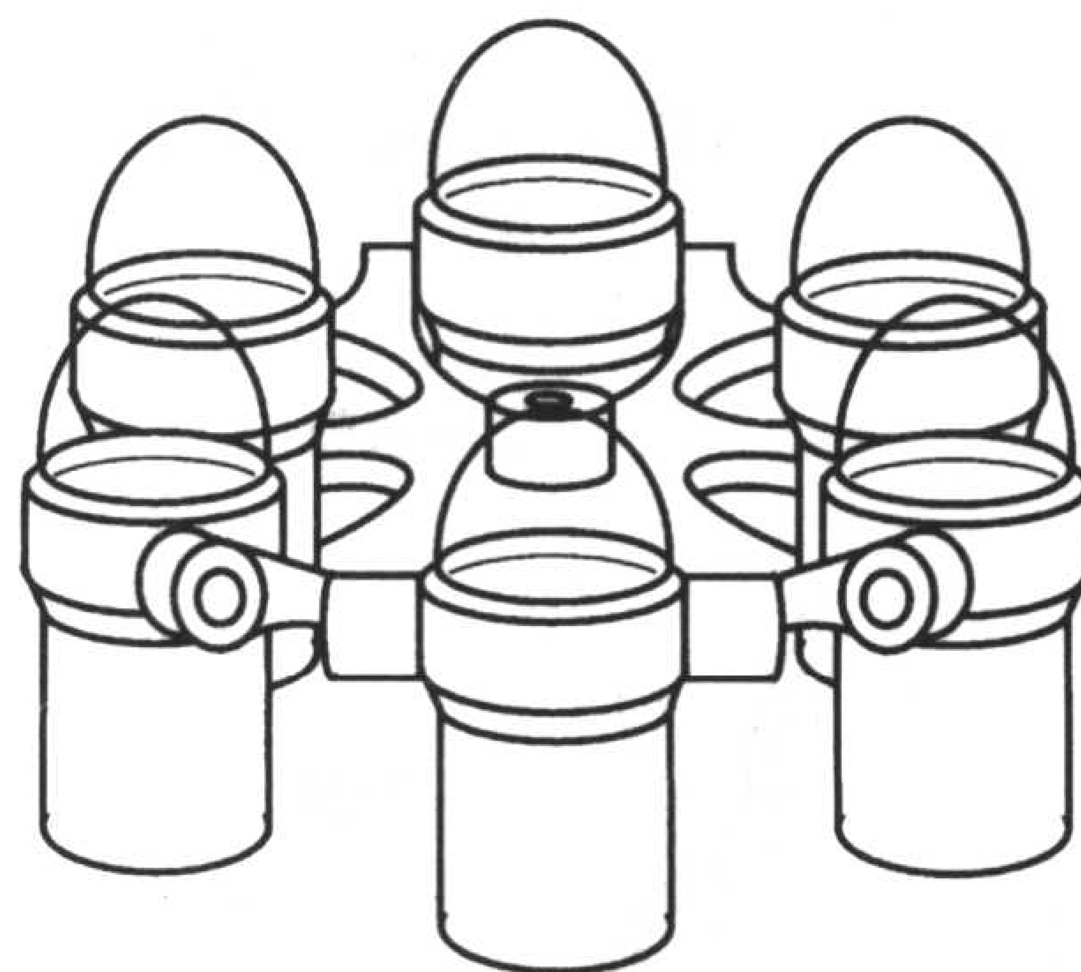


图 14-14 许多耳轴型外摆式转子上的离心桶或杯带有盖子与“O”型环，可以兜住生物危害性或危险材料

梯　　度

梯度用来分开成分复杂的溶液，分离特定分子。

☆ **常用密度介质**。密度介质具有不同的密度、黏度、浓度以及重量摩尔渗透压浓度。有一些细胞不能经受住某些介质，并且在存活力或者功能上有所损失。因此在为细胞启用某种特定介质之前，应该请教周围的人。

- **Percoll**。一种合成的聚乙烯吡咯烷酮包裹的硅胶胶体悬浮液。设计用作沉降离心。在角式转头中，自动形成线性梯度。适于分离细胞器与细胞。
- **Ficoll**。一种蔗糖的聚合物，Pharmacia 生产。在高浓度时往往不及其他介质那样黏。用于细胞的分离。
- **Metrizamide（Nygaard）**。Metrizoate 的非离子化衍生物。用于细胞的分离。
- **蔗糖**。蔗糖溶液用于分离细胞器，很少用于分离细胞。
- **氯化铯**。一种用于等密度分离的盐，最常用于质粒 DNA 的分离。

☆ **制备梯度**。可以手工、离心、泵或者用梯度制备仪制备梯度。非连续梯度（或分步梯度）通常用手工制成，因为所需要做的就是在密度较高的介质层上再铺上密度较小的介质层。一个替代方法是用一个长针头注射器将密度逐渐提高的介质层注入到

管子的底部。

一个平稳的密度范围内的连续梯度可以用离心的方法获得。例如分离质粒 DNA 时，氯化铯在离心过程中形成梯度。梯度制备仪混合密度介质与稀释介质，并且把浓度逐渐降低的溶液泵入到一个管子中，可以用来制备线性梯度，或者（在程序模式下）制备分步梯度。

☆ **吸取氯化铯条带**。如果第一次跑梯度，很有可能是用氯化铯通过离心来分离质粒 DNA。在你尝试之前，请人带你做一遍完整的过程。

氯化铯条带从管子中取出之后，还必须将溴乙锭从 DNA 中去掉。这通常是用有机溶剂抽提的方法来完成的，而实验方案可以从大多数分子生物学手册中找到。

你应该咨询 EHS 官员溴化乙锭的处置问题。简单地往溴化乙锭中倒入漂白剂是不对的。在大多数实验室，溴化乙锭在实验室内部得到净化，然后按危害性废物处置。

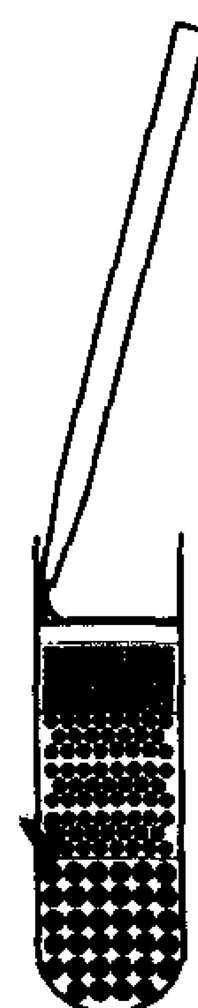


图 14-15　用注射针筒或者吸管缓慢地在高密度介质上铺陈低密度介质来制备梯度。使溶液在稍稍高于液面的地方沿着管壁轻缓地流下去，这样不会搅动梯度

离心机与转子的维护

☆ **离心机的维护**。安全地使用离心机是最佳保养方式。

- **立即清洗离心机内的任何飞溅物**。用水和温和清洁剂。如果是冷冻离心机，别让清洗液体结成冰。清洗后用纸擦干。
- 碳刷指示灯亮起时，打电话给维修服务人员。作为马达的一部分，碳刷磨损了必须定期更换。
- 如果离心机不启动，不要立即陷入恐慌之中。有多种安全设施用来保证离心机不会启动，除非所有的设定正确无误。如果离心机不启动，检查：

1. 离心机接通电源，控制面板灯亮（如果有的话）。
2. 速度已设定。有时候人们在离心结束时把速度调至零，而那就是你现在得到的转速。
3. 离心机处于恰当的温度。如果温度设定在某个特定值，而离心机还没有到达那一温度，等待直到温度到达设定值。
4. 门关上，锁住。

> 许多实验室有一个针对所有离心机的服务计划（不包括小离心机）。基本上讲，这是一个保险计划。院系或者实验室付给某公司一笔钱，而该公司负责所有故障的费用，有些服务合同甚至包括保养。在你打电话给制造商或者服务人员要求处理离心机问题之前，检查一下是否有服务计划。

☆ **转子维护**。转子要经受巨大的力量，看起来很小的缺陷在巨大离心力下变得很大。一旦结构的完整性被破坏，转子很快就会损坏。预防性的保养是避免问题的惟一途径。

- *遵守每一转子的速度与样品密度额度*。离心力可以使金属产生应力，使之伸展，改变大小，而不恰当的速度是罪魁祸首。每一超速离心机转子都有一个最大转速，并且是转子名字的一部分。例如，SW28 最高可以达到28 000 rpm。但是，一般建议 SW28 转子不要在25 000 rpm 以上运行。核查制造商手册，找出每一个转子的推荐

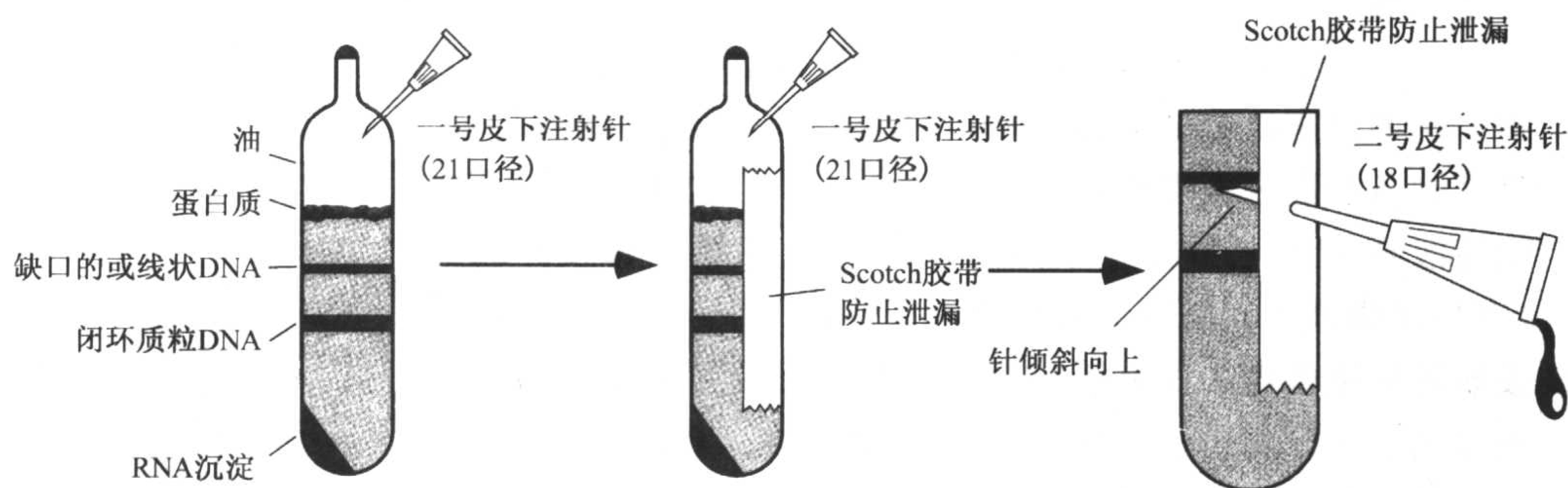


图 14-16 从含溴化乙锭的氯化铯梯度中收集质粒 DNA
(经允许重画，Sambrook 等，1989)

使用速度。

- 不要超过质量保证期使用转子。质量保证期是基于一定数量的运行次数或者使用小时数。超过保证期后继续使用，厂商认为是不安全的。一般只有高速与超速离心机转子有这样的保证。
- 根据厂商的建议，定期检查转子。
- 保持转子内腔与离心管洁净。潮湿化学物品或者碱性溶液如氯化铯和其他盐类等可能导致金属表面腐蚀。每一次使用之后都要清理。

> 千万不要用普通瓶刷或者锋利金属球来清洗转子的内腔与离心筒，这些刷子可能损伤转子。只能使用塑料包裹的刷子。

☆ 清理转子

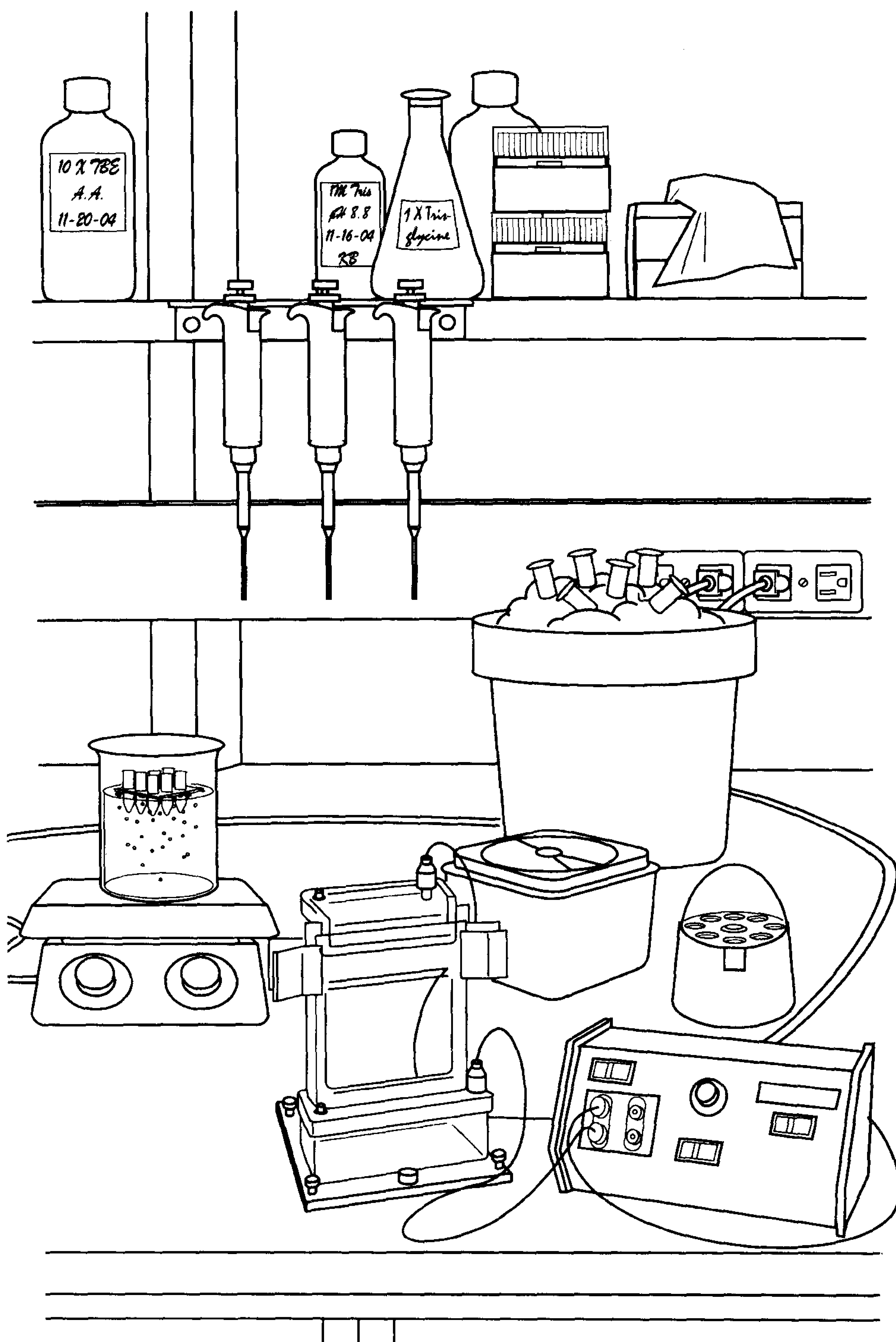
1. 从外摆式转子中取下离心管。转子本身绝不可浸入水中，因为悬吊装置很难干燥，容易生锈，而角式转子可以整个冲洗，但也不宜浸在水中。
2. 用水冲洗每个离心管或者内腔。倒置角式转子时要非常小心，如果有溅出的液体，用水冲洗。
3. 如果放射性污染没有被清洗掉，或者曾经溅出，要用温和的洗洁剂。请交易商推荐一种洗洁剂。多数用于清理放射性污染的试剂呈强碱性，不宜用在转子上。
4. 用蒸馏水或者去离子水冲洗。
5. 把离心桶或者角式转子倒过来，置于纸巾上，空气干燥。
6. 储存转子于干燥的地方。所有的角式转子应该拿掉盖子，倒置储存。外摆式转子应连同离心桶一起储存，但是离心桶盖要拿掉。

(沈水源　王维荣　黄伟达)

参 考 文 献

Brush M. 1997. High speed centrifuges. *The Scientist* **11:** 21.
http://www.the-scientist.com/yr1997/sept/profile2_970929.html
Centrifugation. Nalgene Centrifuge Ware, Sigma catalog, p. 2067, 1996. Sigma-Aldrich,

Milwaukee.
Collins C.H., Lyne P.M., and Grange J.M. 1996. *Microbiological methods,* 7th edition. Butterworth-Heinemann, Oxford.
Freshney R.I. 2000. Physical methods of cell separation. In *Culture of animal cells. A manual of basic technique,* 4th edition. Wiley-Liss, New York.
Gerhardt P., Murray R.G.E., Wood W.A., and Krieg N.R., eds. 1994. *Methods for general and molecular bacteriology.* American Society for Microbiology, Washington, D.C.
Gershey E.L., Party E., and Wilkerson A. 1991. *Laboratory safety in practice: A comprehensive compliance program and safety manual.* Van Nostrand Reinhold, New York.
Griffith O.M. 1986. *Techniques of preparative, zonal, and continuous flow ultracentrifugation.* Applications Research Department, Spinco Division, Beckman Instruments, Fullerton, California.
Heidcamp W.H. 1995. *Cell biology laboratory manual.* Gustavus Adolphus College, St. Peter, Minnesota.
http://homepages.gac.edu/~cellab/index-1.html
Rotor Safety Guide. 1987. Spinco Division of Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, California.
Sambrook J. and Russell D. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual,* 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
Sambrook J., Fritsch E.F., and Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual,* 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.


10 X TBE
A.A.
11-20-04
1M Tris
pH 8.8
11-16-04
KB
1 X Tris-
glycine

第15章 电　泳

电泳，带电分子在电场中的分离，是任何实验室中的一项基本技术。通过电泳，混合物中的各分子由于大小、形状和电荷不同而相互分开。它是DNA测序、Western印迹等实验的第一步。有些实验室中电泳是自动的，但在大多数实验室中，DNA、RNA和蛋白质的电泳分离是手工完成的，灌（制）胶（分子分离于其中的基质）是一项日常工作。

不管你的样品是小样制备的质粒或者纯化的蛋白质，电泳的步骤是相似的。跑过一次电泳胶后，所有其他的胶将是类似的。

基本规则

- 操作胶盒之前要关掉电源。
- 上样和电泳前，确定胶已经凝固。
- 立即记录你上了些什么样品。当你点样至胶孔时，使管子在管架上的次序与你点样的次序一致。实验时不要丢掉管子，只需把用过的管子移到另外一排。用这个次序去核对你的实验方案，把每一孔道的内容记录下来。
- 戴上手套。如果要接触胶或者胶缓冲液的话。缓冲液中可能含有溴化乙锭（EtBr），EB一种强诱变剂，还可能含有少量的丙烯酰胺粉末。
- 不要在食物专用微波炉内融解含溴化乙锭的琼脂糖凝胶。
- 不要让凝胶在胶盒中太干燥。一旦电泳结束，应处理掉缓冲液，用蒸馏水冲洗胶盒。
- 正确接通导线。黑色是（-）负极。红色是（+）正极。检查导线是否插进电源输出装置，是否连上胶盒，再次检查。听起来难以置信，每个人都会犯这种错误，可能只有一次。样品在电泳时会朝向上的方向迁移。

> 接通胶盒的电源之后，观察一两分钟，以确保样品朝正确的方向迁移。

普通电泳

☆ 样品制备

- 样品必须完全溶解于缓冲液（也称为上样缓冲液），否则不能在凝胶中移动。样品太浓可能产生假相。
- 样品缓冲液包含盐类（维持样品）、甘油（增加重量从而使样品下沉至点样孔）、以及示踪染料（以便监测电泳进程）。
- 样品缓冲液可以分装成小部分冻存。
- 缓冲液加到凝胶上之后才能点样。

- 样品缓冲液中的示踪染料可以指示什么时候终止电泳。两种最常用的染料是溴酚蓝（BPB）与二甲基苯青 FF。

☆ 标准分子质量

- 标准分子质量应同时电泳，用来检测电泳进展以及分析结果。
- 使用相适应的标准分子质量。
- 胶连同分子质量标准物一起拍照。标上各条带的大小。
- 标准分子质量有带标记的与不带标记的两种。标记可以是荧光、发光体或者放射性元素。如果手边没有带标记的标准物，可以将染色后的胶与事后标记的印迹相比较。
- 在每一块胶的同一泳道点上标准物。比较容易做的是把标准物加在第一个泳道。总是将标准物点在第一泳道，就能知道胶的方向。
- 只要有可能，点上正对照与负对照。

☆ 样式

- 琼脂糖凝胶一般以水平方向进行电泳，而聚丙烯酰胺凝胶则是以垂直方向进行电泳。潜水型胶是一种水平方向胶，凝胶被浸淹在电泳槽的底部。
- 凝胶可以制成多种大小。测序胶必须制成大胶，但是对于大多数筛选与转移用胶，甚至包括双向凝胶来说，只要你不是想把分子量相近的条带区分割，小型胶就可以了。
- 毛细管电泳利用开口狭小的毛细管来进行 DNA、蛋白质和其他小分子的自动高效分离。分离是与检测分析相连，就像色谱仪器一样。只有专门实验室才有毛细管电泳设备。

☆ 凝胶

- 聚丙烯酰胺 vs 琼脂糖。尽管凝胶电泳可以在滤纸、醋酸纤维素、淀粉或者其他基质上进行，大多数研究者还是只采用聚丙烯酰胺或琼脂糖凝胶。两种都是多孔性胶，像分子筛样起作用（聚丙烯酰胺或者琼脂糖的百分比越高孔越小）。理论上，任何一

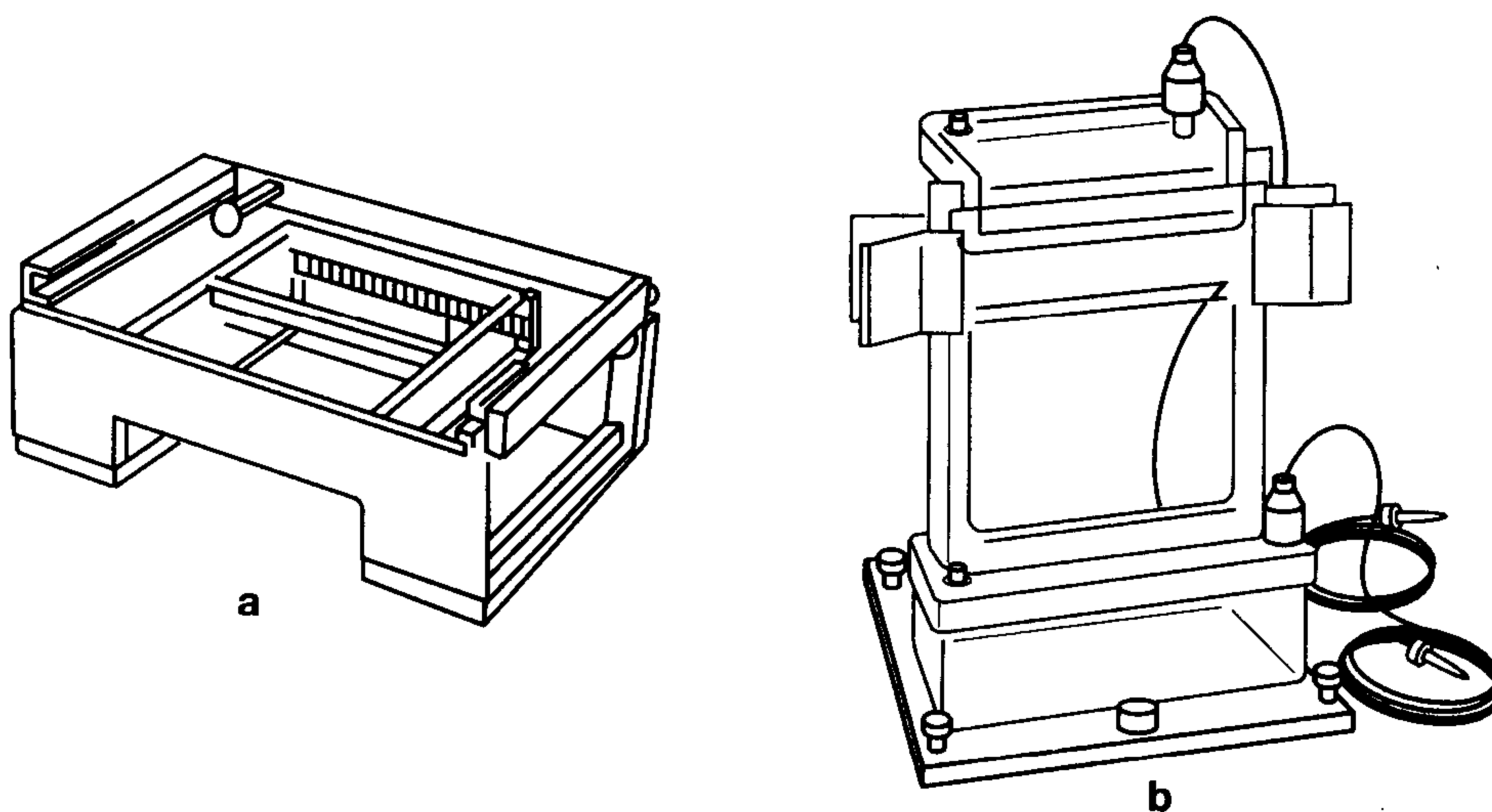


图 15-1　胶盒样式

a．水平槽用于琼脂糖凝胶；b．垂直槽用于聚丙烯酰胺凝胶。

种都可以用来分离 DNA、RNA 或者蛋白质。但是，聚丙烯酰胺在低百分比浓度时很软，难以用手操作。一般采用高百分比浓度，用以分析蛋白质和小核苷酸。

- 低百分比琼脂糖凝胶相对较硬，易于操作，用来分离目的分子，如 DNA 和 RNA 或者巨大的蛋白质和蛋白质复合体。
- 胶的浓度必须与片断大小相适应。
- 许多公司出售预制胶，比较贵，几美元一块，可储存于4℃几个月。但如果你跑的是梯度胶或者不经常跑胶，就很合算。有一种多胶配制系统，一次可以制胶多达 10 块。
- 每次切去胶的同一小角。这样，万一胶掉落、翻转或在转移过程中放置凝胶，都能给定位做参考。

☆ 缓冲液

- 大多数电泳缓冲液配成高浓度母液，在电泳前稀释。
- 每一种缓冲液在某一电流时会有特定的电压。要认识每一种缓冲液的特性，这样，当什么地方出错时，你马上就可以注意到。

☆ 电源

- 电源输出有几种模式：稳压（mV)、稳流（安培，或者简称安）以及稳功率（瓦特，瓦)。许多型号允许你设定程序，在各种模式之间自动转换。这样你可以使用最佳的电压（在电泳过程中可能发生变化）同时不超出容量。
- 不是所有的电源输出装置都相同，所以不能简单地将电泳装置接到手边任意一个电源装置上。要清楚你需要什么电流或者电压，然后找出能提供这些参数的装置。
- 大多数实验室都有不止一个的电源装置用于测序胶（要求高电压)、电泳转移（要求高电流）以及一个用于琼脂糖和聚丙烯酰胺电泳（使用大范围的电压）的装置。很少有电源装置能同时满足所有的要求。
- 变性蛋白胶与 DNA 和 RNA 胶中的样品将会从负极（阴极）移到正极（阳极)。用红色导线接正极（+)，黑色导线接负极（-)。

表 15-1　电流效应

电流（mA）		效　应
交流电	直流电	
≤1	5	没有感觉
1～8		电击感觉，不疼
8～15		疼痛性电击，个别人可以摆脱紧握
15～20	75	肌肉控制丧失，不能摆脱紧握
20～50		肌肉收缩，呼吸困难
50～100	300～500	可能的心室纤维颤动
100～200		一定的心室纤维颤动
≥200		严重灼伤，肌肉收缩严重以致心跳停止

电流不完全取决于电压，也取决于身体的阻尼。总的来说，身体对电击的阻尼是最小的，产生 45～60mA 电流的电压就是致命的。(经允许重画，Gershey 等，1991)。

- 可以用同一个电源输出装置同时进行几块胶的电泳，但是在没有问过其他人前不要

这样做，因为电泳条件会发生变化。

• 利用电源装置带有定时器从而自动终止电泳。否则设一个定时器提醒自己察看胶。特别是当你要察看低分子质量的分子时，样品很容易跑出胶进入缓冲液中。
• 电泳槽制造得很安全，所以如果你遵守最高规则，就不需要担心。接触任何东西前，确信电泳装置必须处于断电状态。如果电源没被切断，不要进行任何操作!

☆ 固定

• 凝胶是否需要固定取决于用途。需要染色的胶一般需要固定，而用于转移的胶则不需要固定。

☆ 干燥

• 通过把水从胶上除去，胶基质则变薄。干燥之后的胶在放射自显影后条带更清晰。
• 在凝胶干燥仪上干燥一块胶不需 1 小时。凝胶干燥仪可以加热，从而加快干燥过程。

☆ 染色

• DNA 与 RNA 的染色可以通过在电泳前把染料加到样品中完成，也可以在事后染色。
• 蛋白质胶在电泳后染色。

☆ 记录

• 凝胶经溴化乙锭染色后的 Polaroid 照片与蛋白质凝胶的 35 mm 照片是最常用的记录方式。
• 数字记录与分析系统正得到越来越多的使用，这样，所有数据可以直接用来演示。
• 各种转移的记录方式取决于体系与实验。例如，放射自显影与化学发光结果可以记录在 X 射线胶片上，而信号可用光密度计定量。

☆ 确定分子质量。蛋白质的分子质量可用 SDS-PAGE 确定，而 DNA 与 RNA 的分子质量可以由琼脂糖凝胶电泳来确定。对某一分子而言，其分子质量的对数与其 Rf（相对迁移距离）存在线性关系。以标准物的迁移距离对其分子质量的对数作图，得到标准曲线，而样品的 Rf 值——因而也就是分子质量——可以由图外推得到。

1. 制胶，胶的浓度应最适宜分离分子质量相近的分子。同时电泳分子质量标准物，其范围涵盖有目的分子的大致大小。
2. 跑胶，防止染料前沿跑出胶的边际。
3. 胶染色，拍照。如果样品是放射性标记的，你可以使用放射性标记的标准物或者把胶与放射自显影胶片相比较。
4. 测定从样品孔到每一标准条带的距离。计算每个数值的对数，画到常规图纸的 Y 轴上。X 轴上是迁移的距离（以厘米计最方便）。对大多数标准物条带应该得到一条直线。
5. 把样品迁移距离画到图上。外推标准曲线，确定分子质量。

> 可以利用计算机由标准曲线外推得到未知分子的分子质量。手工制作曲线的优势在于知道蛋白质的分子质量是否落入标准曲线的线性（和正确的）部分。

特殊电泳

DNA 凝胶

DNA 胶用来分离、确定或者纯化 DNA 片段。用于 DNA 测序反应的测序胶不在这儿讨论。每位实验室成员有不同的制胶方法，请别人给你演示一遍，照着做，直到掌握为止。

> 通常等到溴酚蓝染料前沿到达胶的底部 3/4 处时停止电泳。

☆ 样品准备

- 6 × 上样缓冲液：30%（V/V）甘油，0.25%（W/V）溴酚蓝，0.25%（W/V）二甲苯腈蓝，蒸馏水配制。贮于 -20℃。
- 样品缓冲液与 DNA 在 60℃ 温育 5 分钟。

☆ 标准分子/分子质量标记

- 琼脂糖凝胶中，指示剂溴酚蓝与分子质量大约 600bp 的 DNA 分子一起迁移，而二甲苯腈蓝则与大约 4000 bp 的 DNA 分子共迁移。确切的迁移与琼脂糖的质量与浓度有关。
- 溴酚蓝与二甲苯腈蓝也可以用做聚丙烯酰胺凝胶中 DNA 的指示染料。
- 市场上有无数的 DNA 标准分子质量标记。其中大多数是已知 DNA 酶切产生的片段组合。这些标准 DNA 标记产生不同大小的片段，使人更容易快速估计未知片段的大小，也提供了胶与胶之间差异的参照。也可以自己制备标准，但是通常太麻烦，不值得这么做。

表 15-2 指示剂染料的迁移

	聚丙烯酰胺（%）	溴酚蓝[a]	二甲苯腈蓝[a]
聚丙烯酰胺凝胶			
	3.5	100	460
	5.0	65	260
	8.0	45	160
	12.0	20	70
	20.0	12	45
变性聚丙烯酰胺凝胶			
	5.0	35	130
	6.0	26	106
	8.0	19	70～80
	10.0	12	55
	20.0	8	28

a 数值表示与染料共迁移的 DNA 片段的大致长度（核苷酸对）。（经允许修改，摘自 Maniatis 等，1982）。

- 分子标尺是 DNA 梯子，各大小片段间有一定的间距。最适用于精确测定样品 DNA 的分子质量。大多数包含有明显可见的参考条带。
- 保留一份你最常用的 DNA 标准分子标记。两组有用的 DNA 标准标记分别为（bp）：λ/*Hind* Ⅲ：23，130，9416，6557，4361，2322，2027，564，125

ΦX174/*Hae* Ⅲ：1353，1078，872，603，310，281，271，234，194，118，72

☆ 样式

- 中型胶盒 vs 小型胶盒。小型胶用于监测酶切进程或者查看质粒抽提的质量，这是DNA胶的两种最大用途。小型胶相对中型胶的优势在于电泳结束的时间较快（不到1小时，中型胶3～4小时）以及所需DNA较少。Southern印迹在大一点的胶上做较好，因为信号可能较弱需要较多的DNA。
- 制备型胶 vs 分析型胶。分析型胶用来收集信息。在制备型胶上，感兴趣的DNA将被取走。制备型胶通常比较大，可容纳大量的样品。一块制备型胶可能只在胶的上端有一个极大的孔。

☆ 分离试剂

- 琼脂糖或者聚丙烯酰胺：分离能力 vs 分离范围！
- 琼脂糖（分离范围大）的使用已经标准化，适于分离200bp～50kb分子，水平方式电泳。10 000kb的DNA可采用脉冲电场凝胶电泳（PFGE）。
- 用聚丙烯酰胺（分离能力好）来分离小的DNA片段，5bp～500bp，通常制备成垂直式凝胶。碱性琼脂糖凝胶用来水解DNA和分析单个DNA链。使用碱性琼脂糖凝胶的原因通常是想查看cDNA合成过程中第一步由逆转录合成的第一和第二条DNA链的大小。往热的琼脂糖中加入碱液会水解琼脂糖，所以先以中性溶液制成胶，再在电泳前用新鲜配制的碱性电泳缓冲液平衡凝胶。
- 经化学修饰的低熔点琼脂糖在较低温度下融化（30℃成胶，65℃融化）。分辨力好于普通琼脂糖，但不及聚丙烯酰胺。在冷库中跑电泳以防止琼脂糖凝胶的融解。低熔点琼脂糖很有用，因为有很多种方法从低熔点琼脂糖中回收DNA。
- 采用合适的琼脂糖浓度。见表15-3。

表 15-3　DNA电泳所采用的胶浓度

种类	成分	分离范围
A	琼脂糖（%）	线性DNA分子的有效分离范围（kb）
	0.3	60～5
	0.6	20～1
	0.7	10～0.8
	0.9	7～0.5
	1.2	6～0.4
	1.5	4～0.2
	2.0	3～0.1
B	丙烯酰胺（%）	有效分离范围（核苷酸对）
	3.5	100～1000
	5.0	80～500
	8.0	60～400
	12.0	40～200
	20.0	10～100

（经允许修改，摘自Maniatis等，1982）

A 选择最能分开你要分析的DNA大小的琼脂糖浓度。

B 如果你感兴趣的DNA小于1kb，可用聚丙烯酰胺凝胶。

☆ 缓冲液

- 制胶和实际电泳采用同种缓冲液。
- 如果你用水代替缓冲液来配胶（这是最常犯的错误之一），胶上几乎没有电导，DNA 就会移动得很慢或者根本不移动。丢弃这块胶，重新配制一块。
- 最常用于 DNA 的缓冲液是 TAE（Tris-醋酸-EDTA）与 TBE（Tris-硼酸-EDTA），TPE 有时也被采用。
- 用不同缓冲液来制胶、跑胶，结果有所不同。例如，双链线性 DNA 片段在 TAE 中比 TBE 或者 TPE 中迁移大约快 15%，而超螺旋 DNA 的分辨率在 TAE 中较好。
- 推荐使用 TBE。它具有最强的缓冲容量。
- 如果忘记在胶中加溴化乙锭，可以加到电泳缓冲液中。

表 15-4　常用电泳缓冲液

缓冲液	工作溶液	高浓度贮液（每升）
Tris-乙酸 (TAE)	1×：0.04 mol/L Tris-乙酸 0.001 mol/L EDTA	50×：242 g Tris 碱 57.1 ml 冰乙酸 100 ml 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0)
Tris-磷酸 (TPE)	1×：0.09 mol/L Tris-磷酸 0.002 mol/L EDTA	10×：108 g Tris 碱 15.5 ml 85%磷酸 (1.679 g/ml) 40 ml 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0)
Tris-硼酸[a] (TBE)	0.5×：0.045 mol/L Tris-硼酸 0.001 mol/L EDTA	5×：54 g Tris 碱 27.5 g 硼酸 20 ml 0.5mol/L EDTA (pH 8.0)
碱[b]	1×：50 mN NaOH 1 mmol/L EDTA	1×：5 ml 10 N NaOH 2 ml 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0)

（经允许重印，摘自 Sambrook 等，1989）

a 高浓度 TBE 长时间储存会产生沉淀。为避免产生沉淀，储存 5×溶液于玻璃瓶，室温，丢弃任何有沉淀的批次。TBE 的琼脂糖凝胶电泳最初采用 1×的工作强度（即 1:5 稀释高浓度贮液），但是 0.5×的工作溶液能提供足够的缓冲能力，现在几乎所有的琼脂糖凝胶电泳都以 1:10 稀释贮液来进行。TBE 的聚丙稀酰胺凝胶电泳是用 1×工作强度进行的，是通常琼脂糖凝胶电泳强度的两倍。用于聚丙稀酰胺电泳垂直槽的缓冲液的贮备液很小，而穿过其中的电流量很大。需要 1×TBE 来提供足够的缓冲能力。

b 碱性电泳缓冲液应该新鲜配制。

☆ 电源

- 电压的使用。随着电压的增大，琼脂糖凝胶的分辨有效范围减小。为获得大于 2kb 的 DNA 片段的最佳分辨率，以 5V/cm 或者更低的电压进行电泳（两个电极之间的距离，cm）。5～10 V/cm 可适用于大多数的胶。对一些缓冲液来说，100 V 大约是 50 mA。
- 如果电泳过夜，总电压可以是 20～25 V。你可以在第二天早上调高电压。
- 采用稳功率而不是稳压或者稳流可以防止大的电压峰或者产生过热。
- 以比普通胶慢得多的速度电泳低熔点胶，避免产热。

☆ 染色

- 胶融化之后加入溴化乙锭。每 10 ml 琼脂糖溶液加 1 μl 10 mg/ml 的溴化乙锭。
- 并不一定要往缓冲液中加溴化乙锭，可以在电泳后染色，胶体中的溴化乙锭已足够看到大多数条带。

☆ 分析

- 胶中的 DNA 可以通过紫外透视灯观察。
- 戴手套，把胶平放在塑料薄膜上。可以用一个托架或者盘子来移取胶/塑料薄膜，但是托盘将会吸收过多的紫外线，可能看不到染色较浅的条带。
- 没有经 RNA 酶处理的 DNA 胶经常可以看到在胶的底部类似扩散条带的tRNA。
- 为什么会有这么多的 DNA 条带？即未被酶切的质粒 DNA 可能在胶上呈现不止一条。因为超螺旋环形（未被酶切）、带切口环形（部分酶切）以及线性（完全酶切）DNA 在胶上以不同速度迁移，因此一个未完全酶切的 DNA 可能显示三条不同的条带。
- 很难预测哪一条带是哪一个 DNA，因为琼脂糖浓度、电流强度与缓冲液类型都有一定影响，但是一般来讲，超螺旋 DNA 像一颗致密子弹一样穿过凝胶，跑得最快，线性及切口 DNA 紧随其后。

☆ 制胶

琼脂糖凝胶

- DNA 胶在用之前现行制备。事先配制的胶可以储存在电泳缓冲液中或者包在塑料薄膜中，置于冰箱过夜。
- 利用稀释后的 10×贮液和琼脂糖来制胶。在三角烧瓶中仅仅配制你所需要的量，或者在玻璃瓶中配制足以制成几块的胶。琼脂糖会固化，但是可以在微波炉中重新融化。储存琼脂糖/缓冲液“溶液”于室温。
- 琼脂糖有几个级别。越纯（越昂贵）污染的蛋白质越少，盐类与其他多糖等污染物也越少。也有适于分离不同大小核苷酸的琼脂糖。如果需要回收 DNA，使用你能承受的最贵的琼脂糖，因为污染物可能抑制酶活性，成为成功克隆的主要障碍。FMC BioProducts 公司是高品质琼脂糖的供应商。

微波炉

危险性：溴化乙锭，一种致畸剂，通常早已加在琼脂糖胶中（尽管它应该在融化之后再加入），会飞溅到微波炉的内部。戴好防护手套，过热的琼脂糖胶会突然暴沸，所以总是应该使用夹子或者热保护手套，不要用纸衬垫。

评论：不要使用金属（包括金属转子）！不要把食品放进任何未经指定食品专用的微波炉！不要把试剂放进食品微波炉！要微波加热的东西下面垫纸垫，使得暴出的液体易于清理。

替代方案：用热搅拌转台。

微波炉加热

1. 把盖子松松地放在瓶子上，必须能让空气流出，否则瓶子有可能爆炸。如果你用的是烧瓶，用大一点的，减少暴沸的可能。你可以让口开着或者用塑料膜松松地扎在

开口上，不要用铝箔!

2. 把微波炉调到高温。新鲜配制的琼脂糖需要比固化的琼脂糖更长的时间来加热。100 ml 的体积可能需要 3～5min，更大的体积需要大约 6～10min。
3. 1 min 后，停掉微波炉，戴着手套抓住瓶子，摇转瓶子及其内容物。混合均匀的东西加热得更快更平稳。
4. 把瓶子放回微波炉中再加热。1 min 后停止，摇匀。
5. 再把瓶子放回微波炉加热，直到它即将沸腾。
6. 用夹子或者耐热手套取出瓶子。
7. 待琼脂糖冷却，直到刚刚能用手触摸。倒胶之前摇匀。如果发现部分琼脂糖已经开始固化，用微波炉稍稍加热一下。

是的。你可以重复使用凝胶。有些研究人员早已利用这种胶来检验酶切反应，只要在再次上样之前让胶上之物跑出胶体即可。每次重新使用都需要再染色，而使用旧的胶并不真能省下多少时间或者金钱。

聚丙烯酰胺凝胶

- 聚丙烯酰胺凝胶必须由丙烯酰胺单体、聚合起始物、催化剂以及合适的盐及缓冲液的混合物仔细地聚合起来。
- 丙烯酰胺与 BIS（*N*, *N*′-亚甲双丙烯酰胺）是形成胶基质的单体。购买预制的溶液吧!
- 过硫酸铵启动胶的聚合过程。胶的配方要求 10% 以水配制的过硫酸铵溶液。大多数实验方案告诉你它要新鲜配制。但是，10%溶液可以放置 4℃ 达数周而没有明显的活性丢失。配制最多 10 ml，当胶不能聚合时或者你认为必要时丢弃。

丙烯酰胺的百分比在测序胶和蛋白质胶中是不一样的。如果你使用预制的丙烯酰胺:BIS 溶液，确保你拿对了瓶子。

- TEMED（*N*, *N*, *N*′, *N*′-四甲基乙二胺）是催化剂，装在棕色瓶中，置于冰箱。在即将倒胶之前添加。
- 聚丙烯酰胺测序胶加有胶缓冲液（TBE）与尿素。尿素是变性剂，使 DNA 反应中发夹环不易形成。
- 聚丙烯酰胺电泳所用的玻璃板在每次电泳之前及之后都应洗净。电泳之后，用软的不会刮伤玻璃的刷子和布在热的肥皂水中清洗，再用蒸馏水淋洗，竖立待干。

未聚合的丙烯酰胺是神经毒剂。要戴上手套，即使在拿聚合完毕的丙烯酰胺时，因为那儿可能有单体的存在。

- 水分及灰尘会导致带空洞的聚合物。电泳之前，用 Windex 或者其他玻璃清洁剂清洗玻璃板，用软刷擦拭。蒸馏水淋洗，用纸擦干，再用 Kimwipe 高级纸彻底擦干。用纸擦拭之前先用 70% 乙醇冲洗有助于清洁，加速干燥。依次加样丙烯酰胺:BIS、水、缓冲液、过硫酸铵、TEMED。混摇均匀，立即倾倒。
- 聚丙烯酰胺聚合前并不一定要脱气。(丙烯酰胺过去放置于真空中以除去气泡，因为氧气抑制聚合。)

☆ 水平胶点样小窍门

组装胶盒

- 放一张黑色纸于胶盒下方，黑色背景使得点样孔看得更清楚。
- 胶槽倒满缓冲液，刚好盖过胶体。

记住样品中包含甘油，会沉到点样孔里。

- 如果边上有一盏头顶灯，把它打开，让灯光直照胶体。把样品吸入移液器。
- 使用自动移液器。
- 插在 10～200μl 移液器上的枪头可用于大多数点样孔。对于非常小的（小于 10μl）点样孔，用那种测序胶所用的长移液头比较方便。
- 将移液头刚好浸入样品，缓慢而精细地吸入移液头。样品可能会因甘油而显黏稠，快速抽吸可能会把气泡吸入移液头。
- 样品吸入移液头之后，让移液头轻轻靠在管子边上，或者用 Kimwipe 高级纸吸走移液头外边的液滴。注意别让毛细作用吸走样品。

将样品点到样品孔中

- 移液器上保持一点点压力，使样品略微溢出移液头。
- 把移液头插进缓冲液，仅略高于点样孔，保持正压。移液头的尖端部分可以伸进点样孔。
- 非常缓慢而稳定地把样品打出去。如果你的移液头尖正处于点样孔上方，样品会沉入孔中。让样品下沉充满样品孔，而不是推入到样品孔中。
- 一旦最后一滴样品打出移液头，将移液器推到第二档，缓慢地抬高移液器，移出缓冲液外。

如果样品不是非常有限，遵照多加 10% 的规则是很有帮助的。对每一个样品，比你所需要的体积多准备 10%。例如，如果你想要点样 1.0μg/5μl，就准备 1.1μg/5.5μl。吸液过程中可能会损失几微升，而这在你比较量的时候是很关键的。稍微多准备一点就可以抛开这种顾虑，使得吸液过程易于完成，就不必非要把最后一滴也吸走。

点样时在样品上保持一定的正压可以在定位移液器时防止气泡或者缓冲液进入移液头。

保留一点空气在移液头中将防止无意抽吸而搅动样品。

如何进行垂直胶的点样

- 垂直胶的点样孔形成于两块玻璃板之间。在非常薄的胶中，移液器移液头甚至不能插入到两块玻璃板之间。注意甘油！把移液头置于样品孔上方，样品会沉入到孔中。
- 点样之前，一定要把垂直型聚丙烯酰凝胶的点样孔冲洗干净。冲走未聚合的丙烯酰胺和样品孔底部可能出现的水，水可以使得样品孔明显变小。使用 25ml 或者 50ml 注射针筒和 18 号针头。抽入电泳缓冲液，用力但是小心地冲洗样品孔中的水。
- 可能难以看清样品孔，但是一旦你点一个样之后，其余的就变得容易了。如果有多余的孔，可以用样品缓冲液与溴酚蓝试验。

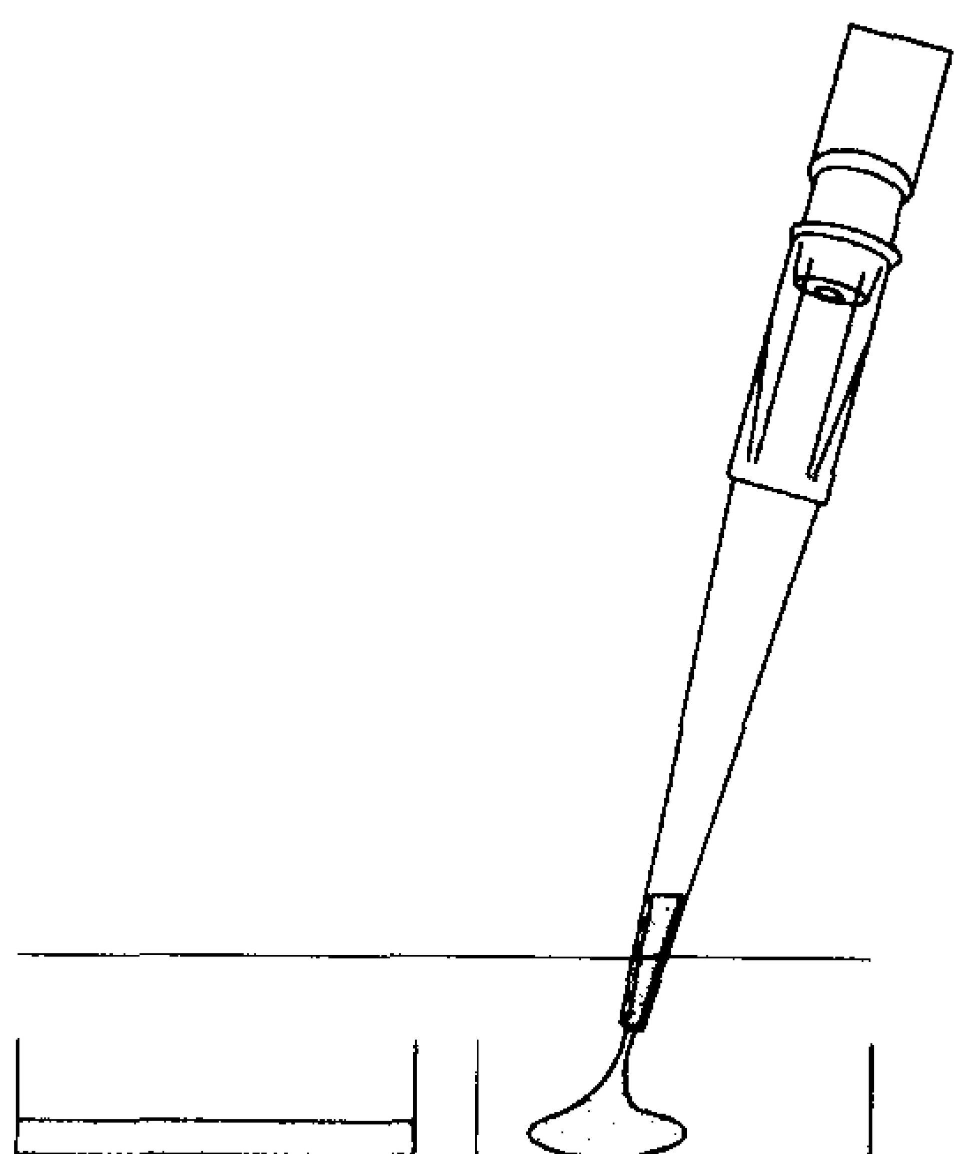


图 15-2　点样时在样品上保持一定的正压可以使定位移液器在点样孔中防止气泡或者缓冲液进入移液头。当你移走移液器时也要维持移液头内的压力

RNA 凝胶

RNA 凝胶是用 Northern 印迹的方法来分析 RNA。mRNA 大约只占总 RNA 的 5%，在溴化乙锭

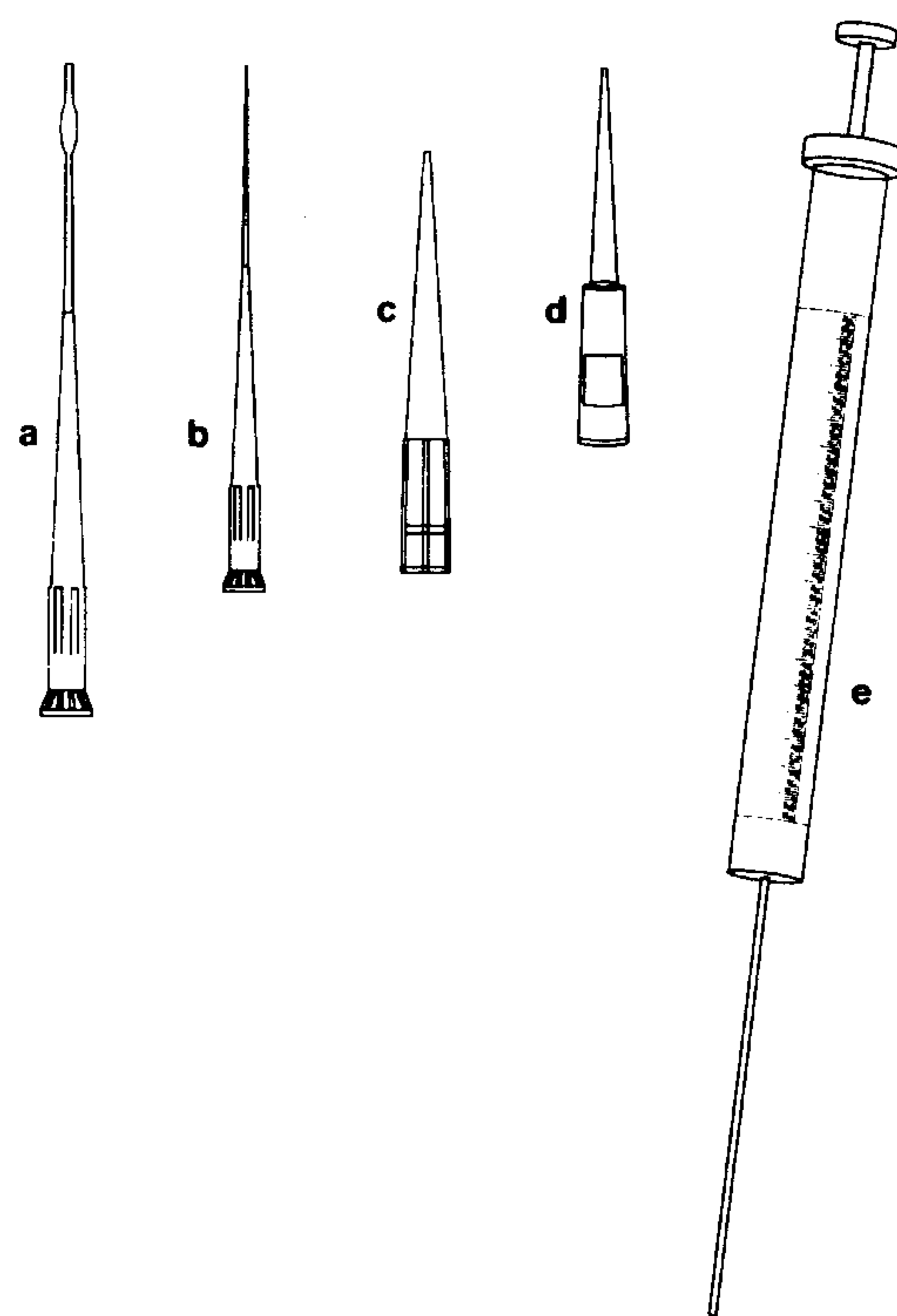


图 15-3

a. 末端扁平 b. 加长圆形的移液头对于垂直型胶很有用，因为移液尖可以插入玻璃板之间。c. 开口大的移液头进行黏稠的 DNA 样品点样比较容易。d. 带有气雾屏障的移液头可以防止移液头上的遗留，用于放射性样品。e. 微量进样器是进行各种胶样品点样的简单方式，两次进样之间用电泳缓冲液将注射针筒冲洗干净。当然，标准的移液器移液头可以用于各种点样

染色的胶上看不到，因此 mRNA 必须用标记探针来检测。

☆ 样品制备

- RNA 样品在电泳之前及电泳过程中必须是变性的，否则分子质量不能被精确测定。变性是由甲醛与甲酰胺来完成的，也可用乙二醛和二甲亚砜或甲基汞（不推荐）。
- MOPS 胶的样品缓冲液：0.75ml 去离子的甲酰胺，0.15ml 10 × MOPS，0.24ml 甲醛，0.1ml 去离子的无 RNA 酶的水，0.1ml 甘油，0.08ml 10%（*W*/*V*）溴酚蓝。分装小管后贮于 -20℃，或者每次新鲜配制。
- 加 25 μl 样品缓冲液到 5μl RNA 样品。你可能需要浓缩 RNA 样品。
- 样品缓冲液中的样品在 65℃ 加热 15min。加 1μl mg/ml 溴化乙锭到每个样品，混匀。不需要将溴化乙锭加到电泳缓冲液中。
- 中型大小的胶，加 5～20 μg 总 RNA，小型胶加 1～5 μg。
- 加 3 μg mRNA 与加 5～20 μg 总 RNA 样相比，会得到更清晰的信号。

☆ 标准参照物/标记参照物

- 需要标准参照。

- 许多人利用样品本身的核糖体 RNA 作为大致的参照。真核生物核糖体 RNA 是 28S 和 18S（大致长 5300 和 2000 碱基）；原核生物核糖体 RNA 是 23S 和 16S（大肠杆菌大致长 3566 与 1776 个碱基）。
- RNA 标准参照有商业制品。DNA 标准参照在甲醛胶中跑得不太好，不应使用。体外 RNA 合成的指定模板可以用来合成长度确定的 RNA 转录物，如果某未知 RNA 的长度必须要精确知道的时候可以采用。
- 溴酚蓝和二甲苯腈蓝可以用来做指示染料。就像在 DNA 电泳中一样，其确切的位置取决于琼脂糖的品质与浓度（见表 15-5）。

表 15-5　RNA 甲醛胶中跟踪染料的迁移

	甲醛胶	
	二甲苯腈蓝	溴酚蓝
SeaKem Gold		
1.0%	6300	660
1.5%	2700	310
2.0%	1500	200
SeaKem GTG 与 LE		
1.0%	4200	320
1.5%	1700	140
2.0%	820	60[a]
SeaPlaque SeaPlaque GTG		
1.0%	2400	240
1.5%	800	80[a]
2.0%	490	30[a]

a 外推法确定的与染料迁移相当的核苷酸数。

☆ 样式

- RNA 凝胶就像 DNA 凝胶一样进行电泳。你并不需要独立的胶盒与仪器。只要在电泳前后清洗胶盒就可以了。

☆ 缓冲液

- 10×MOPS/EDTA 缓冲液，包含 0.2mol/L MOPS（3-吗啉代丙磺酸）、50 mmol/L 乙酸钠、10 mmol/L EDTA，调至 pH 7.0。高压灭菌 15min。时间长了呈现淡黄色是正常的。1×用于电泳。
- MOPS 缓冲液（和其他 RNA 缓冲液）离子强度很低，电泳过程中，沿着胶的长度方向会产生 pH 梯度，导致胶的水解。这只有在非常长的电泳过程中才可能成为问题，可以通过用蠕动泵循环缓冲液或者间歇性地把缓冲液从一端吸到另一端来避免这个问题。

☆ 凝胶

- RNA 必须在变性条件下电泳。MOPS-甲醛胶是最安全最好的一种。
- 甲醛胶必须在通风橱内倒胶，并静待固化。热的甲醛会蒸发，吸入危险。做之前要

请别人指导。

- 含甲醛的琼脂糖凝胶比普通琼脂糖凝胶易碎，必须小心操作。
- 1%或者1.2%的胶适用于大多数 Northern 印迹。

☆ 电源

- 对电源的要求同 DNA 琼脂糖凝胶。对于中等大小的胶，100V（大约 50 mA）将花去3～4小时。

☆ 染色

- 由于溴化乙锭已包含在样品缓冲液中，不需要进一步染色。

☆ 分析

- 核糖体亚基应该是分开的。除非上样太多，否则各亚基不应该分不清楚，如果不能分清意味着降解。
- mRNA，如果在胶上可见，看起来像是一片糊状。

蛋白质凝胶

大多数蛋白质凝胶电泳是还原性条件下的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。

☆ 样品准备

还原试剂2-巯基乙醇或者二硫苏糖醇加在变性胶的样品缓冲液中，还原蛋白质中的二硫键，确保蛋白质维持在测定分子量所需的无规则卷曲状态。在通风橱中使用还原试剂的贮液。

- 样品缓冲液分成小管，贮于－20℃。甘油浓度很高，足以防止样品冻结，所以你不必担心冻融所造成的损伤。当管中没有还原试剂的味道时，就该取用一管新的还原试剂了。
- SDS-PAGE：2×缓冲液包含4% SDS、20% 甘油、10% 2-巯基乙醇（或 100 mmol/L 二硫苏糖醇），0.004% 溴酚蓝，0.125mol/L Tris-HCl，pH 近似于6.8。
- 样品必须在即将上样之前，在样品缓冲液中煮沸（或95℃加热）5min。如果你在烧杯或者水浴锅中加热，使用漂浮管架。必要时，可以用苯乙烯塑料，戳上几个洞即可。煮沸后管子置于冰上冷却。打开盖子时，紧紧抓住管子，万一管内压力没有完全释放，可以防止盖子弹出。
- 如果你盖紧盖子煮样品，盖子有可能弹开，而整个管子可能爆到空中。有几种方法可以避免这种情况：可以等到样品即将开始爆炸时，轻轻打开管子释放压力；可以用一枚针在每个管子盖上戳一个小孔，但这不能用于放射性样品。有几种煮样品用的架子，可以将小管子的盖子紧紧夹住，防止它弹开。最佳解决之道是使用一个塑料夹子，套紧小管的盖子防止其弹开。

☆ 标准参照物/分子质量标记

- 标准参照物有高范围、低范围以及宽范围的。市售的有未染色的或预染色的，预染色的更方便使用。除非另有说明，标准参照物应贮于－20℃。
- Amersham 公司的彩虹标准参照很有用（也很漂亮），其每种蛋白质染成不同颜色，

但价格昂贵。每一种蛋白质都很清晰，监测电泳进程变得非常容易。

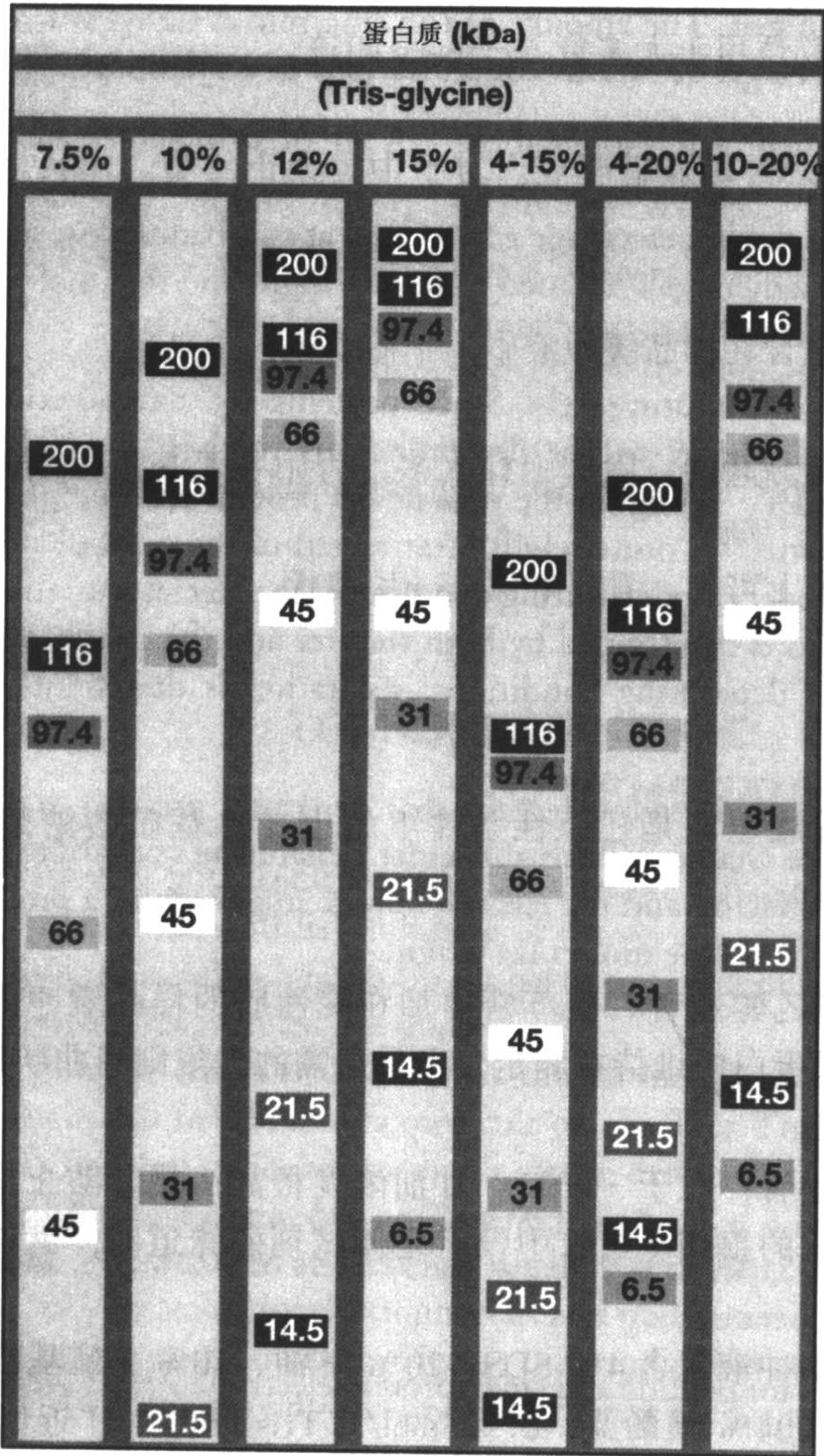


图 15-4　蛋白质分子质量标准参照

采用 Tris-甘氨酸缓冲液，分子质量分别为 200kDa、116kDa、97.4kDa、66kDa、45kDa、21.5kDa、14.5kDa 和 6.5 kDa 的蛋白质在经过不同浓度聚丙烯酰胺凝胶电泳后的位置。(经允许重画，摘自 Bio-Rad laboratories，Hercules，California)

- 染料与标准分子质量标记的共价结合使蛋白质分子质量产生变化。要精确测定分子质量应使用经校准的分子质量标准参照。
- 生物素化的标准参照可以引入到免疫印迹的辣根过氧化物酶（HRP）或碱性磷酸酶检测步骤中。其他标记参照是设计用于银染或其他染色方法的。
- 大多数的标记参照是为 SDS-PAGE 设计的。如果是非变性胶，必须使用设计用于非变性胶的标记参照。

☆ 样式

- 聚丙烯酰胺凝胶总是倒在两块玻璃板之间。两块玻璃板有间隔片分开。间隔片有不同的厚度，与相同厚度的梳子配套使用。
- 连续胶 vs. 非连续胶。连续胶系统有一块在阴极与阳极之间使用同一种缓冲液的分离胶。非连续胶分两个部分：浓缩胶（大孔胶）铺陈于分离胶之上。在非连续胶系统中，阴极与阳极之间使用不同的缓冲液。非连续胶系统的分辨率好。
- 双向凝胶用来更精确地分析蛋白质，样品电泳两次，分别被称为第一相与第二相。第一相是一个等电聚焦凝胶（IEF），一般以管状胶的形式电泳，以确定各蛋白质的等电点。然后将胶放置在板状胶的上面以备第二相电泳，根据分子质量大小电泳后使蛋白质得到分开。
- 管状凝胶 vs. 板状凝胶。管状凝胶曾经用于一般电泳，现在仅用于双向电泳的第一相。

☆ 凝胶

- 38:1（聚丙烯酰胺:BIS 的质量比）质量比是蛋白质凝胶制胶所用贮液的通常比例。制胶时，取用不同的 38:1 混合物的量，以制得不同丙烯酰胺浓度的胶。
- 梯度胶或非梯度胶。非梯度胶的丙烯酰胺就一个百分比浓度，能将一个条带与周围条带分开，适于观察分子量相近的两条条带。梯度胶则能将大分子量的条带与小分子量的条带在同一块胶上得到分离。
- 变性胶或非变性胶。因为蛋白质是两性化合物，它们的净电荷是由所处环境的 pH 值决定的。根据蛋白质的 p*K*a 与周围介质的 pH 值某蛋白质会被吸引到阴极或者阳极。因此，在非变性条件下，蛋白质的电泳分离是由该蛋白质的大小与电荷共同决定的，在变性条件下的分离只由大小决定。
- SDS-PAGE。SDS 是阴离子型去污剂，使蛋白质变性带上负电荷。在变性条件下电泳，电荷不再是一个影响因素，蛋白质的电泳迁移只依赖于分子质量。

☆ 缓冲液

- 大多数蛋白质凝胶应用甘氨酸-Tris 缓冲液（196 mmol/L 甘氨酸/0.1% SDS/50 mmol/L Tris-HCl，pH 8.3）。配制至少 2L 的 10×缓冲液，贮于室温。
- Tricine［三（羟基）甲基甘氨酸］缓冲液用于肽与小蛋白质（2～80 kDa）的电泳。

☆ 电源

- 25～30 mA（200V）条件下电泳。通常在染料前沿到达胶的底部时停止电泳。
- 蛋白质穿行于浓缩胶时，电泳要慢一点，低于 50 V。一旦样品处于浓缩胶与分离胶的界面时，可以调高电压至 200 V。

☆ 染色

- 电泳之后凝胶的染色是与染色液一起温浴，然后多次洗涤以除去多余染料。
- 最常用的染色液是 0.2% 考马斯亮蓝，在 45:45:10 的甲醇:水:乙酸混合液中 37℃ 摇染 2～3 个小时。用 25:65:10 的甲醇:水:乙酸脱色。
- 银染是更灵敏的染色方法，用于考马斯亮蓝染色很淡或根本不染色的蛋白质的染色。使用起来也更复杂。

将胶内物质转移到膜上

凝胶是厚而易碎的基质，这使得操作与温浴都很困难。如果要对胶内的内容物进行杂交，必须将内容物从凝胶引导到硝酸纤维素膜或者尼龙膜上。这一过程称为转移。

转移之后，滤膜与一个探针温浴，观察探针是否能与滤膜上的分子杂交。探针由放射性元素或者其他指示剂标记，所以可以被检测。滤膜与探针的杂交称为印迹。

第一次使用印迹技术是由 Southern 描述的，因此，这种印迹被称为 Southern 印迹。不同种类的模板与探针的使用有不同的名称。

> **Southern 印迹：滤膜上的 DNA 由 DNA 探测。**
> **Northern 印迹：滤膜上的 RNA 由 DNA 或者 RNA 探测。**
> **Western 印迹：滤膜上的蛋白质由抗体探测。**
> **Southwestern 印迹：滤膜上的 DNA 由蛋白质探测。**
> **Middle eastern 印迹：Poly（U）来源的滤膜由 mRNA 探测。**

生物材料由凝胶转移到滤纸或膜上有三种方法：

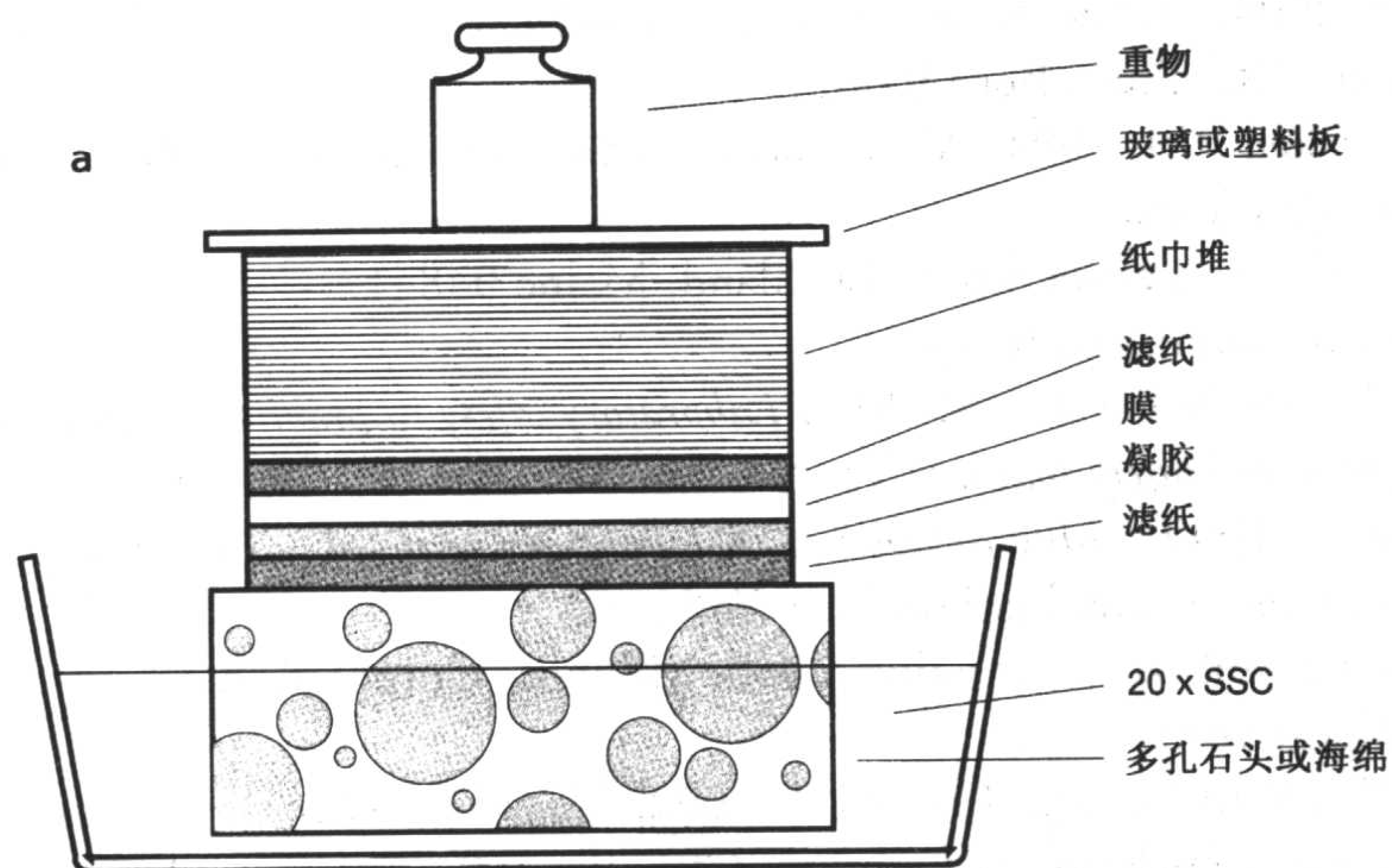
毛细管转移：用于 DNA 和 RNA。

真空转移：用于 DNA 和 RNA。

电泳转移：用于 DNA、RNA 和蛋白质。主要有两种装置来做印迹，都是利用电流来驱动分子向阳极方向转移到膜上。它们是干式转膜仪或半干式转膜仪（电流是由浸在阳极与阴极转移缓冲液中的滤纸来携带的）和湿式转膜仪（其中凝胶与膜都浸在转移缓冲液中）。电泳转移需要能输出高电流的电源装置。

☆ 滤膜

- 市售的膜有整卷的或大小预先裁剪好的两种。除非实验室每个人使用同样大小的凝胶，否则购置整卷的。
- 裁剪或移动任何滤膜的时候要戴好手套。手指上的油脂会阻碍转移。
- 用干净的平头镊子来夹取滤膜。锋利或尖的镊子会戳坏滤膜。
- 转移用膜的选择主要是尼龙（种类繁多）和硝酸纤维素膜（普通型或者易于操作的乙酸纤维素增强型）。
- 尼龙膜最适合核酸。耐用、与核酸结合能力强、膜上物质可以脱去而用于多次杂交。尼龙往往染色背景较深，因此杂交过程中需要高浓度的封闭液。阳离子化的尼龙膜最适宜核酸，因为与核酸的结合并不依赖于缓冲液的离子强度。核酸不能通过电泳转移到硝酸纤维素膜上。
- 硝酸纤维素膜最适合某些蛋白质，而尼龙膜最适合于另一些。尼龙通常有更强的结合能力，但是有些蛋白质根本不结合。尽管实验室工作人员会信誓旦旦地说这种或那种最好，但基本上两种都可以。如果你不得不使用硝酸纤维素膜，使用增强型的硝酸纤维素膜。可以尝试一下 PVDF（聚偏二氟乙烯）尼龙膜，比如 Millipore 公司的 Immobilon-P 可用于 Western 印迹。



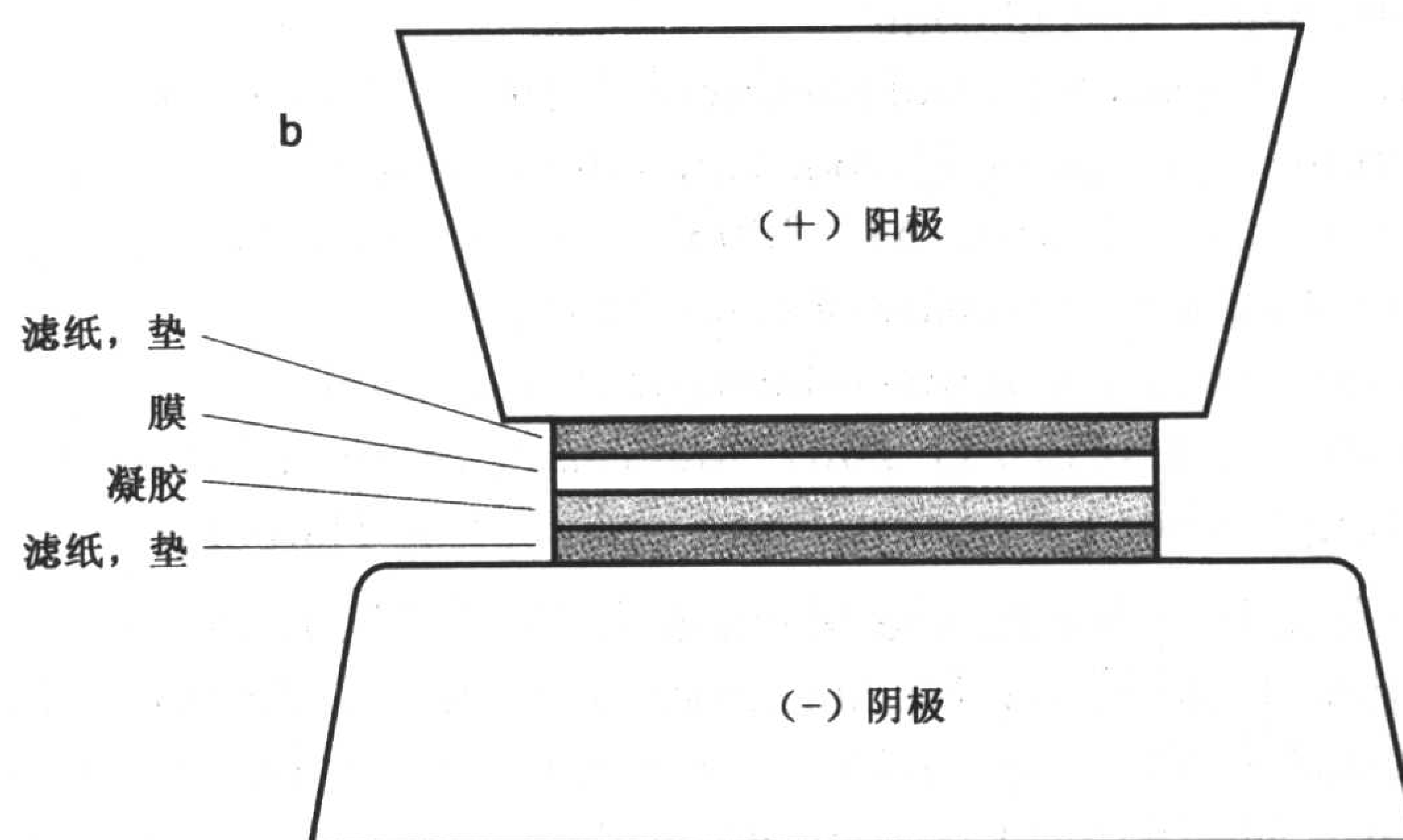


图 15-5

a. 依赖于盐溶液移动的分子的毛细管转移，它由底盆吸出，穿过凝胶与膜进入到一叠纸巾中，同时携带着DNA 或 RNA 分子。真空转移按同样方式组装。b. 电转移依赖于带负电荷的 DNA、RNA 或者蛋白质在通向阳极过程中从凝胶到膜的转移。湿法印迹中，整个系统被浸入到一种缓冲液中，而半干法印迹中滤膜是由分开的阳极与阴极转移缓冲液湿润的，以使电流流通。

- 硝酸纤维素膜和尼龙膜的实验方案很不一样。实际上，不同类型的尼龙有不同的实验方案。
- 你一般不需要担心孔的大小，0.45μm 是标准。较小孔径的滤膜可以用于专门用途。

(沈水源　王维荣　黄伟达)

参考文献

Brown T.A. 1994. *DNA sequencing. The basics.* IRL Press at Oxford University Press, New York.

Cseke L.J. et al., eds. 2004. *Handbook of molecular and cellular methods in biology and medicine,* 2nd edition. CRC Press, Boca Raton.

Darling D.C. and Brickell P.M. 1994. *Nucleic acid blotting. The basics.* IRL Press at Oxford University Press, New York.

FMC BioProducts. 191 Thomaston Street, Rockland, Maine 04841. http://www.cambrex.com/default.asp

Gershey E.L., Party E., and Wilkerson A. 1991. *Laboratory safety in practice: A comprehensive compliance program and safety manual.* Van Nostrand Reinhold, New York.

Harlow E. and Lane D. 1999. *Using antibodies. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Immobilon-P Transfer membrane user guide. 2000. Millipore Corporation. http://www.millipore.com

Kaufman P.B., Wu W., Kim D., and Cseke L.J. 2002. *Handbook of molecular and cellular methods in biology and medicine,* 2nd edition. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Life Science Research Catalog 2004. Bio-Rad Laboratories, Hercules, California. http://www.bio-rad.com/

Maniatis T., Fritsch E.F., and Sambrook J. 1982. *Molecular Cloning: A laboratory manual,* 1st edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

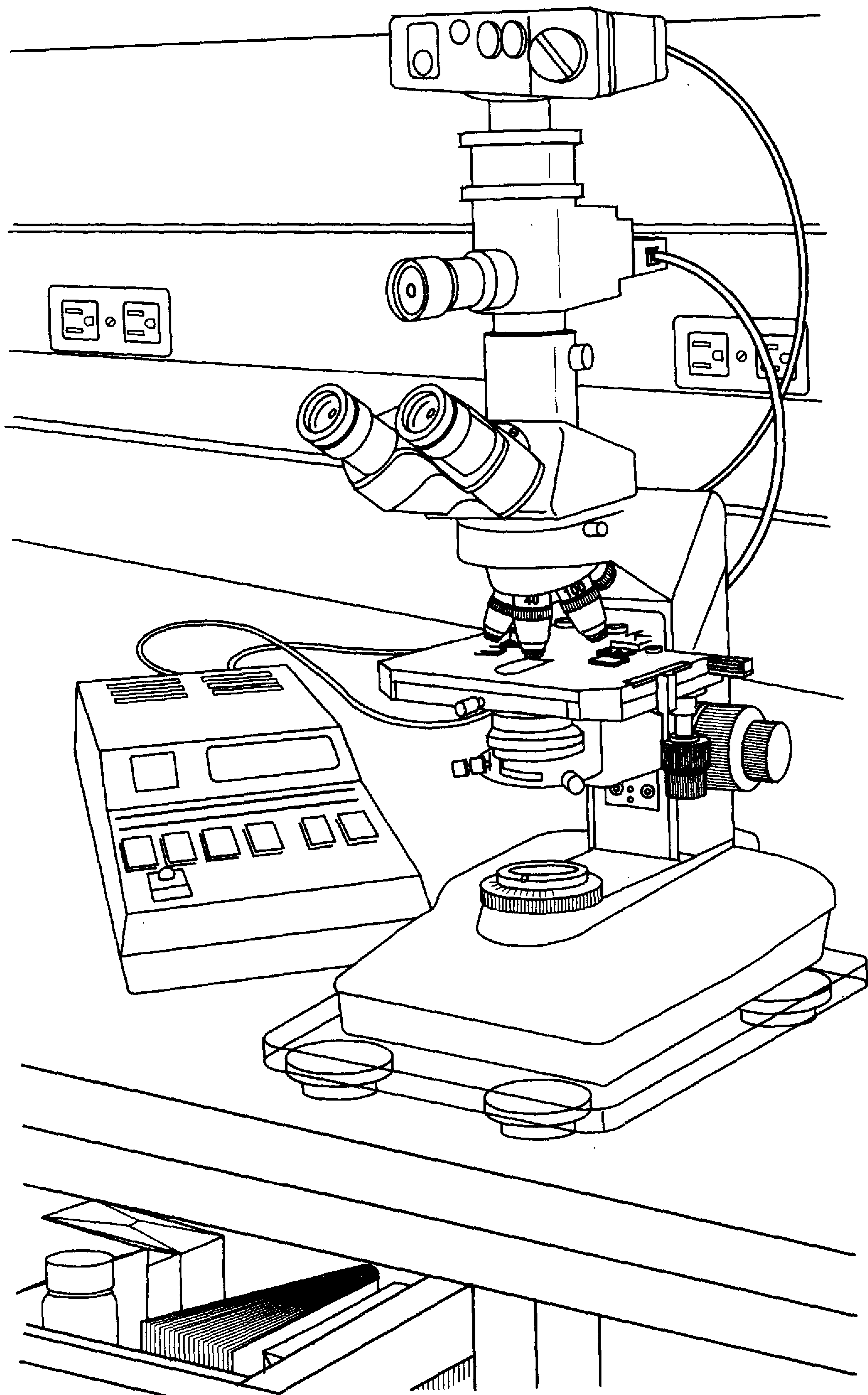
Rybicki E. and Purves M. 2003. SDS polyacrylamide gel electrophoresis. Dept. Microbiology, University of Cape Town, SA. http://www.uct.ac.za/microbiology/sdspage.html

Sambrook J. and Russell D. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual,* 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sambrook J., Fritsch E.F., and Maniatis T. 1982. *Molecular cloning: A laboratory manual,* 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sigma Catalog. 2004. Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri.

Southern E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98:** 503–517.



第16章　光学显微镜

显微镜是实验室中的主要机械装置，被用于从检查培养物的无菌到测定细胞内大分子的运动这样的一切事情。由于具有不同的用途和显微镜的种类，了解显微镜的一般特性，在适应新的显微镜和新实验时是有帮助的。另外，因为多数显微镜是公用的，保持这些交流技能的精练也是有帮助的。

背　　景

通常认为**显微镜的主要目的**是对观察目标大小的显著放大作用，这一点毋庸置疑，但更为重要的是显微镜还提供了分辨力，两点间的最小距离可以被分辨。

提供分辨和放大作用的是两种控制光操作——光镜和透镜，多数显微镜维持所有重要透镜的结构，然而不同质量的透镜能够改善相对放大的分辨率。分辨不依赖于放大，如下公式所示：

分辨率＝0.61×光源波长/数字光圈

数字光圈（N.A.）是透镜聚光能力的描述，是光透过特别透镜传播角度和透过标本和前物镜之间传播媒介（折射率）的几何学计算。每一个物镜有一个数字光圈等级，数字愈高，透镜所能提供的分辨率愈高。

折射率（n）是衡量光被折射的一种测定，较高的折射率引起更多的光被透镜聚集，因此会有更好的照明和成像能力。油比空气折射率高（1.5 vs. 1.0），但只有在透镜数字光圈值大于1.0的情况下，使用油浸透镜才能增加数字光圈的光圈值。

> 使用最短波长（约426 nm）的可见光作光源和使用显微镜油，光学显微镜最大分辨率是200 nm。

影响总放大倍数的因素更为简单，总放大倍数是物镜放大倍数与目镜放大倍数的乘积。

为了看得到，通过显微镜成像必须与周围环境有一个高的对比度。对比度可以通过改变透过透镜的光的程度和角度来改变，也可以通过控制照射光源的强度或通过光圈和相环改变进入聚光镜的光来改变，还可以通过放在光源上面的滤光片过滤掉一些特别波长的光来改变。对比度也可以通过染色标本来增加。

显微镜的种类

透镜、滤光片和照明可被用于放大、分辨和增加成像操作。样本的类别和所需要的记录决定了选择的方法，尝试着不要被手头拥有的设备所局限，多数情况下增加一些配件可以改变你的系统，下面描述的是一些最常见的显微方法。

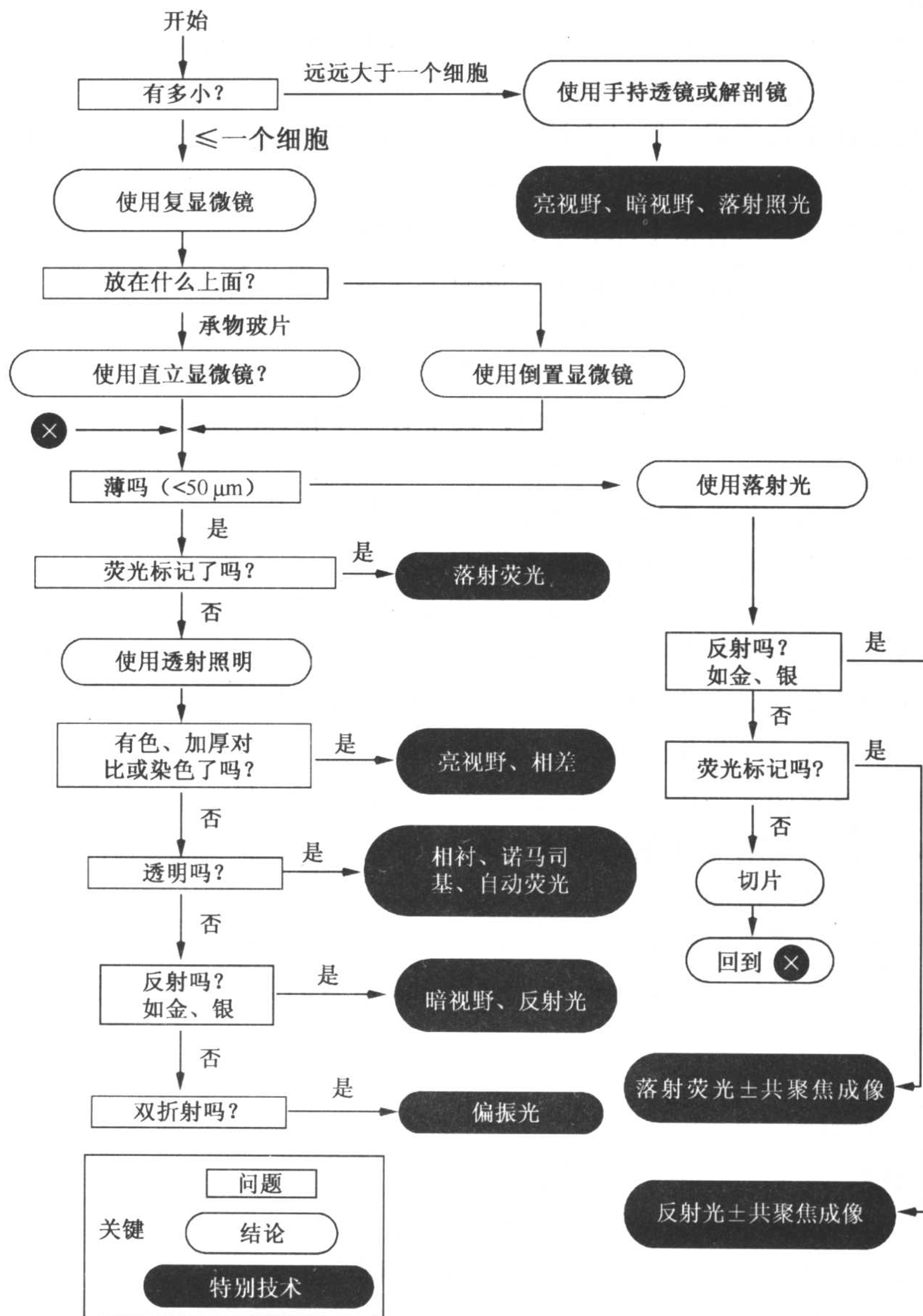


图 16-1　选择显微镜观察方法的流程图

☆ 明视野显微镜

应用：观察活组织和固定的组织、细胞和微生物。

优点：容易获得，简单。

如何作用：这是一种标准光学显微镜，连接起来的显微镜实现最大的光照（库勒照明）。

显现：白色背景下显示灰色或深色的成像。

适用：任何原核或真核生物。

配件：任何光学显微镜，带有最小为 12× 和 40× 物镜、10× 目镜和光源。

☆ **暗视野显微镜**

应用：通过反射光和折射光观察非常小的结构和湿的染色标本。

优点：可以观察低对比度或非染色标本。

如何工作：样本被照明，但只有被物体反射和衍射光线（不是背景）进入物镜，因而视野的背景是黑暗的，物体边缘是亮的。

显现：视野明亮，暗背景下能够看到发光的物体。

配件：带深背景光圈的光学显微镜，深背景安装在聚光镜下滤色片架子上，将深光圈周围的光线照向样本。如果没有，可以放上一个硬币或剪一张原形卡纸代替。将聚光镜移动到一个位置，使得硬币或环形四周光线以环形照明。高放大倍数的显微镜中，带虹膜的暗视野物镜是需要的，或带有一个特殊的暗视野聚光镜。

☆ **相差显微镜**

应用：在湿剥制、非染色和非剥制样本引入反差（相差）。

优点：不固定或不染色也可看到样本。

如何工作：组合了两个光滤片（或环）相互补充，第一张滤片挡住除了周界以外所有的光线，第二张滤片挡住了所有周界的光线，在镜中成了第一个的像，因此，所有直射光被挡住，只有非直射的折射光和衍射光可以照向样本。

显现：许多深色或浅灰色色彩。

配件：两张滤片必须衬在显微镜上，一个在聚光镜下，另一个在物镜内。

☆ **Nomarski 成像［微分干涉差显微镜（DIC）］**

应用：观察透明的内部结构。

优点：样本不需要固定和染色，可以观看活的组织和细胞。

如何工作：光透过样本时的光程差（光通过高折射的区域速度变慢）被转化为振幅差，引起更大的相差。

显现：一个三维影像。

配件：特殊物镜。

☆ **荧光显微镜**

应用：标记/可视细胞或细菌的离散部分。

优点：可以看到普通光线看不到的细胞或器官部分。

如何工作：样品被一种或多种荧光分子标记，激发后荧光分子发射出的光线通过滤片控制呈现色彩和对比。

显现：亮光，通常是暗背景。

配件：激发光源与染色荧光相配的光学滤片特殊物镜。

☆ **倒置显微镜**

应用：观察烧瓶或培养皿中活培养物的形态，培养皿中贴壁细胞的原位染色。

优点：工作距离长。

如何工作：与复显微镜类似，但聚光镜在物镜上面，提供给烧瓶或培养皿较大空间。

显现：黑的和淡灰色。

适用：对组织培养工作为必要。

需要：倒置显微镜、一个长工作距离相衬的聚光镜和相衬物镜提供对比、一个 40×

或更高倍数的物镜观察污染。

☆ **激光共聚焦显微镜**

应用：确定细胞器官的细胞位置、细胞骨架和大分子追踪组织中特别细胞的三维和四维构造。

优点：消除聚焦闪烁、降低背景。

如何工作：激光扫描荧光标记的样本，连续成像可以重建三维影像。

显现：与普通荧光成像相似，分辨率更高。

适用：如果背景复杂可以进行显色研究，如显色一个细胞中的细菌或一个细胞蛋白质。

配件：共聚焦显微镜、计算机。

☆ **电子显微镜**

电子显微镜利用电子而不是光作为照明源，它的波长仅有 0.04 nm，大约是可见光的 10^{-4}倍。由于光源的波长远远小于可见光，因此能够达到的放大倍数和分辨率要比光学显微镜大得多，但技术难。电子枪产生的电子通过真空管传播，代替玻璃透镜的是用电磁来聚焦电子束，玻璃透镜仅用于放大影像。

样本的制备很复杂，电子显微镜通常只安放在特殊的实验室或者只在公用仪器室使用。

☆ **透射电子显微镜（TEM）**

应用：观察内部结构。

优点：因为电子是光源（分辨率因较短的波长而增加），分辨率高，可以结合免疫学标记进行定位研究。

如何工作：钨丝产生电子，电子被电磁场聚焦到已固定、切片和染色的样本，成像被捕获在胶片或磷光屏上。免疫电子显微镜可与抗体、金或其他金属染色使用。

显现：黑的和白的横切面。

配件：透射电子显微镜。

☆ **扫描电子显微镜（SEM）**

应用：观察内部结构。

优点：因为是电子束扫描样品（分辨率因较短的波长而增加），分辨率高但没有透射电子显微镜高。

如何工作：样本被聚焦的电子束扫描，产生次级电子碰撞，被检测和转化为电视屏上的影像。

显现：显示细胞外部的三维结构。

配件：扫描电子显微镜。

光学显微镜的使用

多数人使用光学显微镜只是为了看一张片子或画一幅图。可能每周只有一次，他们匆匆坐下，看一张片子，很快擦好透镜后离开。实验室有人被指派负责显微镜，所有的其他人被禁止改变显微镜上的任何物件（除了基本操作过程）。你应该知道如何调整光

和透镜实现最大照明和高分辨率，如何擦透镜和如何调换光源。

显微镜操作时的舒适感是非常重要的。舒适使用显微镜，你可以监测细胞或细菌的污染，即使你面对的惟一生物体是大肠杆菌。显微镜是进行形态学和功能研究所不可缺少的。

使用规则

- **与负责人联系**。确认你能够使用显微镜。即使你是使用显微镜的老手，最好还是请负责人演示如何操作，解释实验室显微镜的使用和维护规则、资源和拆卸。
- **保持工作区域绝对干净**。不要带食品、饮料或培养物到显微镜旁，千万不要在显微镜边上制备样品或进行玻片染色。
- **如果有签名簿，每次都要签名**。不要忘记登记，对于荧光显微镜和电子显微镜来说，保持使用显微镜记录是特别重要的事情，因为灯泡或钨丝的使用寿命能够被推测到。
- **不要随便旋动旋钮**。按旋钮是关掉显微镜的连接，除非你确实在连接显微镜，否则别动所有的旋钮，除了聚焦旋钮。
- 结束时**将显微镜恢复到常规的安装**。拆去多余的透镜、测微计和所有会影响下一位使用者正常使用显微镜的东西。
- 结束时**关掉**显微镜。
- 每次使用油浸透镜都要**擦拭**。
- 每次使用后**盖上显微镜罩子**，养成习惯。

> 打开或关掉电源会缩短灯泡的寿命，当有人在等待使用显微镜时，荧光显微镜的通常不关机，电子显微镜（通常是关掉电子束，在使用之间不关机器）和共聚焦显微镜也是如此。

> 不要用 Kimwipes 无尘纸擦拭显微镜镜头，它会像卫生纸和纸巾一样划伤透镜，使用专用镜头纸擦镜头。

复合光学显微镜的部件和使用

学习识别光学显微镜的各个部件，了解它们在正确操作中的必须作用，然后观察培养物，记录实验数据并发表。了解越多，观察越好，越能拍到好照片（见图 16-2）。

- **照明的种类**。卤素灯光（或石英灯光）非常强，有很高的色温，意味着最终光线非常白。卤素灯光是显微镜最好的光源类型。钨灯光（或白炽灯光）的色温较底，给出黄光光源，但比卤素灯便宜。
- **调换灯泡**。惟一的规则是需要时确认灯泡。找到放置替代灯泡的地方，如果没有，立即订购两个，或者从手册中查找信息，也可以打开灯泡外罩看看灯泡上有什么特殊的说明。
- **物镜**。每个物镜都会标有数字光圈（N.A.）（数值越高，分辨率越高）、类型和放大倍数。

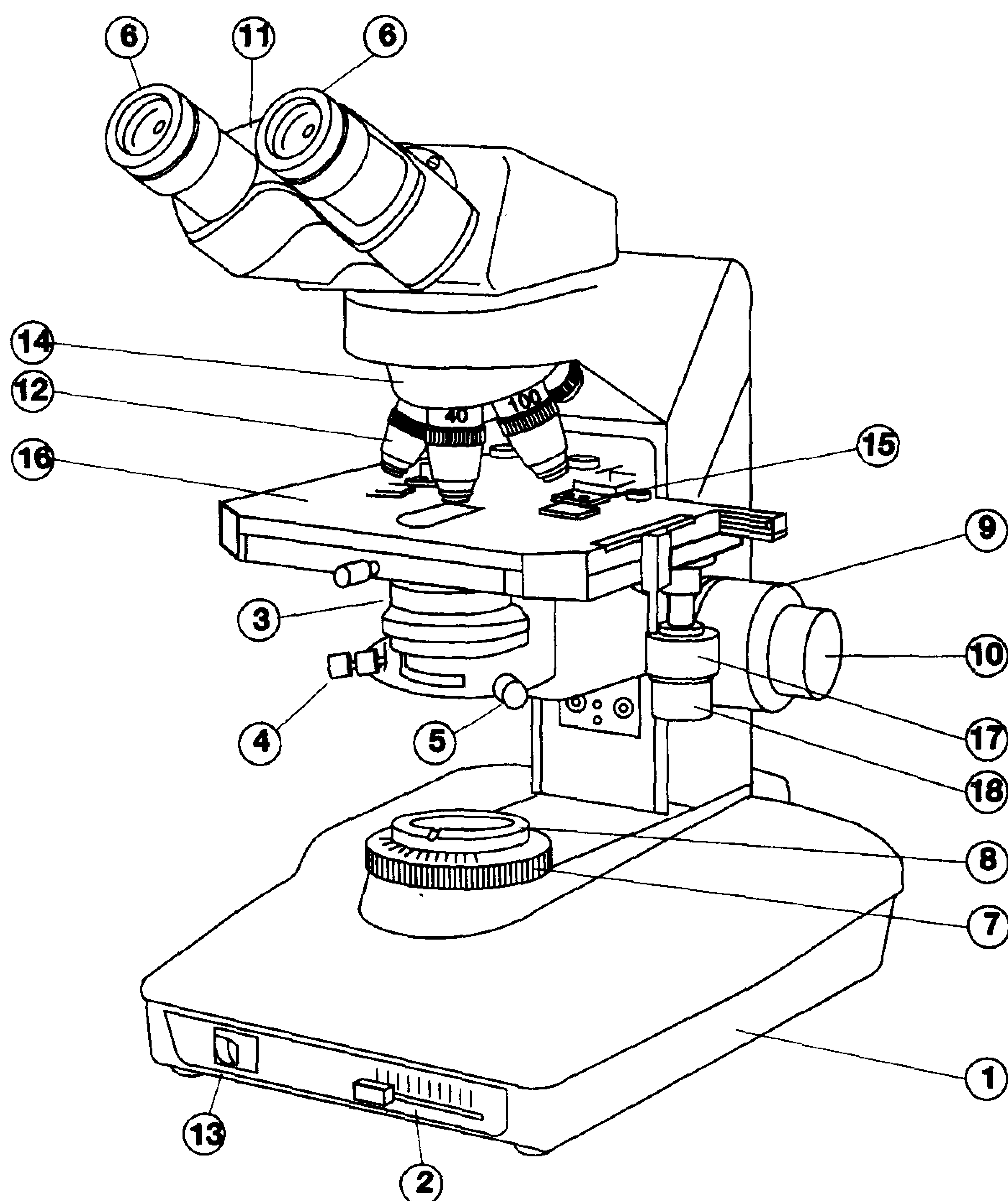


图 16-2 复合光学显微镜

①底座，显微镜稳固的底部；②亮度控制钮，控制光强；③聚光镜，用于获得亮光尤其是视野，能影响分辨率、对比、聚焦深度和亮度；④聚光镜光圈控制环，与聚光透镜连在一起，通过限制光束的直径减少散射的光线，可以控制分辨能力、对比、聚焦深度。将环 70%～80% 敞开能减少分辨率和亮度，但能增加对比和聚焦深度；⑤聚光镜中心旋钮，使照明聚光镜定位于中心；⑥目镜部分，包括目镜；⑦视野光圈控制环，视野光圈用于限制照明区域，不用于调节光强；⑧视野透镜，光源直接位于视野透镜下面；⑨粗调，聚焦，朝自己相反的方向旋转是降低透镜，向着自己的方向旋转是升高透镜；⑩细调、聚焦，朝自己相反的方向旋转是降低透镜，向着自己的方向旋转是升高透镜。如果调得过于下面，向你自己的方向回调，用粗调重新聚焦；⑪瞳孔间距，显示两个目镜间的距离，调节到左右视野变成一个；⑫物镜，产生原初图像的透镜。物镜的质量决定了显微镜的分辨能力；⑬电源开关，打开或关闭光源，显微镜不用时关闭电源；⑭分辨旋转鼻甲，物镜被旋转入分辨旋转鼻甲，任何一个没有物镜的开口必须用一个旋转盖盖上，通常物镜旋入鼻甲的次序是顺时针，旋转时的放大倍数增加；⑮玻片支架，玻片应紧贴于支架上；⑯平台，放置样品观察的区域；⑰平台 y 轴移动钮，旋转移动钮可以将平台上下移动；⑱平台 x 轴移动钮，旋转移动钮可以将平台左右移动。

CF 消色差透镜，CF 平面消色差透镜和 CF 平面高度消色差透镜三种。CF 消色差透镜适合于一般观察，但分辨率和对比仅仅在透镜的中心被校正；CF 平面消色差透镜的外周也被校正过，这种透镜适合于显微摄影；CF 平面高度消色透镜被近一步

校正，能保证色彩再现性和最平坦的视野，适合显微摄影和详细观察。

相衬物镜可以用于其他类型的观察。相衬物镜有一个相板连接、覆盖在焦点平面，但多数被物镜聚集的光不会遇到这个板，影像质量有些轻微降低，亮视野观察比较好。

- **测定**。有几种机械附件可用于测定光学显微镜样本的大小，校准玻片如血球计（见第 10 章）和 Petroff Hausser chambers（见第 11 章）常被用于测定大小，但栅格常被用来粗略估计样本大小。目镜千分尺（放在目镜内部）可以比较视野下已知大小的样本与栅格。目镜千分尺的像不会被拍照，当然，如果需要非常精确的测定或永久样本的测定记录，最好使用千分尺校准标准。

在观察样本时，应该有一种感觉样本“真正”大小的能力，比较未知样本与记忆中的已知样本能够起到一定的帮助。

典型生物样本的大小：

原核细胞（大肠杆菌），0.4×2 μm

出芽酵母（酿酒酵母）2～4 μm

人红血细胞，7.2μm

组织培养的真核细胞，10～100 μm

核，5～25 μm

线粒体，1～10 μm

溶酶体和过氧化物酶，0.2～0.5 μm

使用显微镜的时候可以戴上眼镜，眼镜只对矫正散光有用，对距离不起作用。

浸油的使用

浸油覆盖在油浸透镜和样本上，提供与玻璃一样的折射率。为获得最大的分辨率，浸油可以加在聚光镜上，那样可以接触玻片的底部，但通常没有必要这么做，常规也不需要这样做，不要使用矿物油或其他油。浸油的目的一般有两种（类型 A 和类型 B），较低黏度的类型 A 选择更多，一些实验室将 A 和 B 混合起来使用，常规使用没有问题。还有一些特殊的浸油，如低荧光和高黏度油。慢慢加油以免造成气泡。

“在油浸下观察”意味着油只是在物镜上。

使用物镜浸油

1. 在 40× 物镜下将样本放在合适的位置，将物镜旋离原位，确认透镜上没有油。
2. 滴一小滴油到玻片上，只需在样本和透镜之间制造“密封”效果的量。
3. 将油浸物镜转到观察位置。
4. 利用细调聚焦使样本清晰。
5. 结束后，将油浸物镜转离玻片。
6. 用镜头纸将透镜擦拭干净。

二甲苯或乙醚等溶剂可用于清除浸油，但溶剂能溶解塑料，多数是有害化学品。有些实验室根本不要溶剂清除浸油，而是用镜头纸擦去所有的油，也可以在显微镜维护人员维护时由维护人员擦掉浸油。

使用聚光镜浸油

> 使用高黏度油以减少油滴滴下。

1. 如果玻片在平台上，移走它。
2. 滴一滴油在聚光镜的顶部透镜上，然后将聚光镜降低到平台下的水平与玻片接触。
3. 在玻片观察目标的背面滴一滴油。
4. 将玻片放到平台降下平台上的玻片（保持油滴在空的中央），夹紧固定位置。
5. 提高聚光镜，让两滴油相遇，使顶上的聚光镜完全被油覆盖。
6. 在样本上滴一滴油，用物镜聚焦。
7. 调节聚光镜，获得库拉照明。
8. 结束后，在取玻片前降低聚光镜。
9. 擦拭平台顶部、物镜、平台下部、聚光镜。用镜头纸擦去浸油，用黏有二甲苯或透镜生产商推荐溶剂的新镜头纸擦拭透镜。

清洁显微镜

- 用软刷或罐装空气去除可见颗粒，透镜区域常会积累大量的灰尘。
- *物镜*。对于污迹，用镜头纸循环擦拭，如果允许用二甲苯，可以在镜头纸上蘸少许二甲苯擦拭已用镜头纸擦拭过的透镜。
- *目镜*。由于眼睛和手指与目镜接触会使目镜染上油腻，用一张镜头纸裹住手指擦拭，注意擦到透镜的边缘，或者用一张镜头纸裹住小木签轻轻擦拭镜头的四周（多数实验室在抽屉里会放有擦拭显微镜的器具，这里应该能发现木签）。
- *平台*。玻片上的油有时会黏到显微镜上，溶剂会损坏平台，所以用干的镜头纸尽可能擦去上面的油，最后用少许乙醇擦拭。

获得最大照明和分辨率

> 这种照明方法是 1893 年德国人库勒发明的，这种照明方法被作为标准连接显微镜的方法。

这一操作过程可以得到非常均匀的视野照明，使得样本的细节能够清晰地观察到，保证照射到样本上的光线尽可能地成为圆柱体以实现最大分辨率。

库勒照明（经 Nikon 公司同意修改）

1. 准备显微镜头

- 打开电源，用亮度调节钮调节到适当强度。
- 将 10× 物镜转到正确位置。
- 旋转目镜部分的曲光度环到零刻度。
- 调节瞳孔间距离使左右视野合并成一个。

2. 眼睛聚焦

- 平台上放上样本。

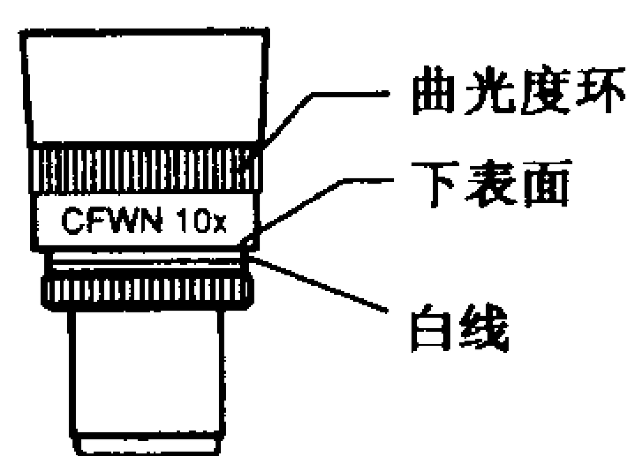


图 16-3　目镜

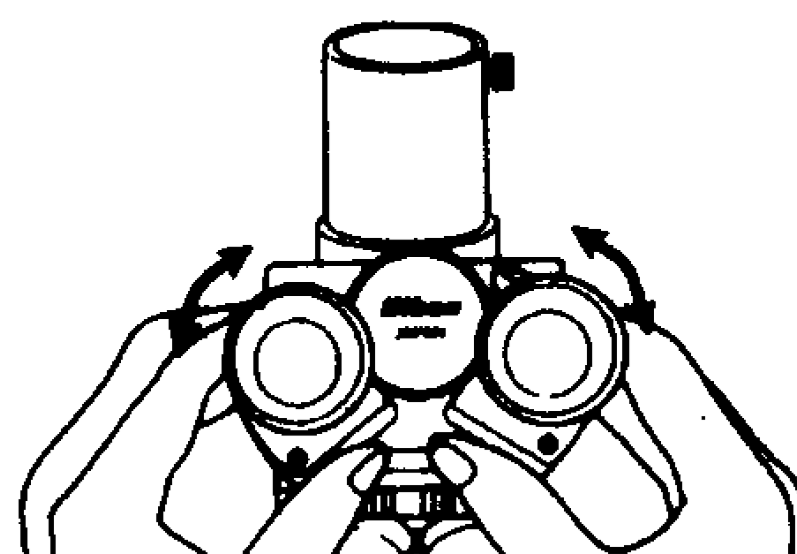


图 16-4　目镜部分

- 使用粗调旋钮，聚焦 10×物镜，用细调旋钮尽可能聚焦最小的细节。
- 换上 40×物镜，用细调聚焦。
- 如果有 4×或 20×物镜，先用它们聚焦再用 40×的物镜聚焦。
- 选择你要观察的目标。

3. 聚光镜聚焦

- 使用视野光圈控制环，将视野光圈关到最小。
- 将视野光圈像用聚光镜聚焦旋钮聚焦。
- 使用聚光镜中心定位钮，将视野光圈像移到视野区域的中心。
- 在消除视野前必须将光圈定位在中心。
- 每个物镜必须检查中心定位。

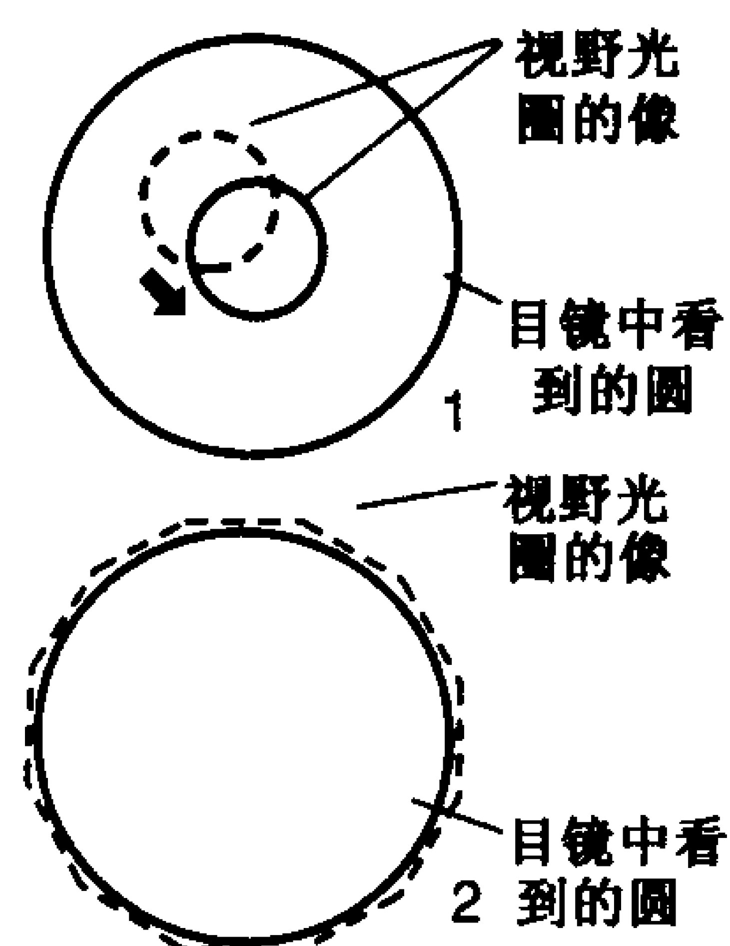


图 16-5　视野光圈像

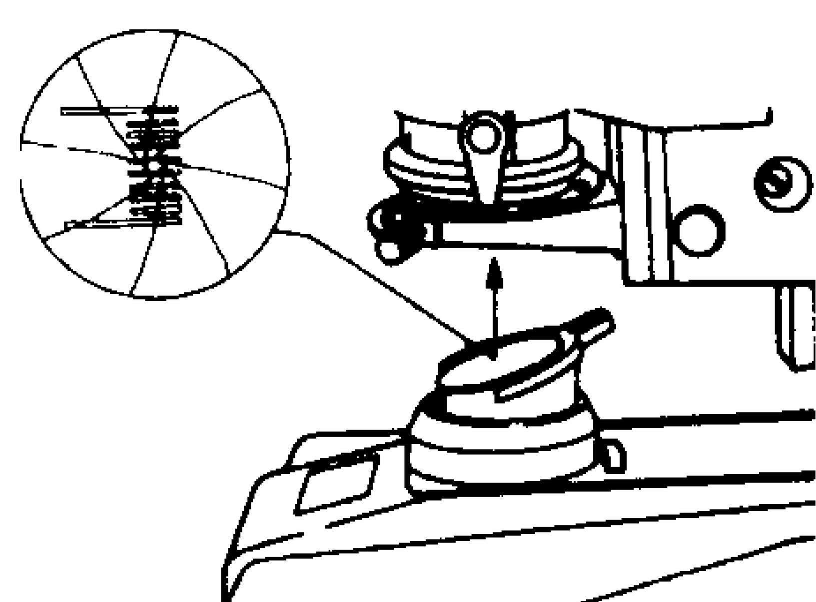


图 16-6　灯丝的像

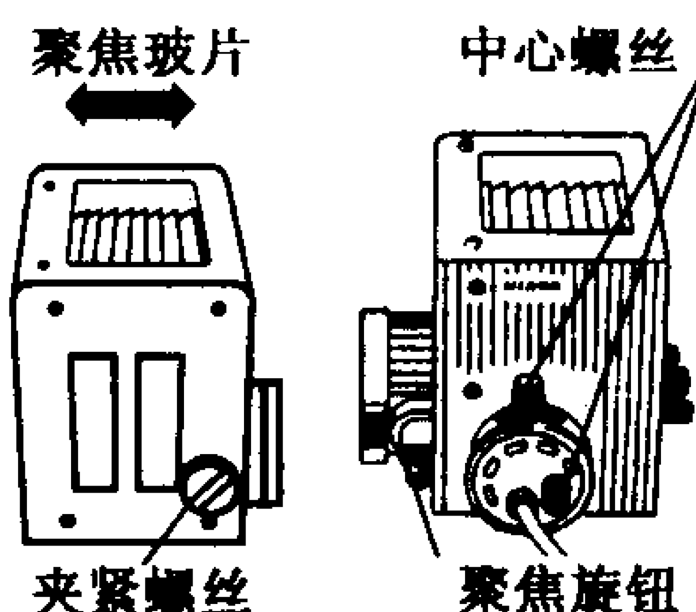


图 16-7　光源箱

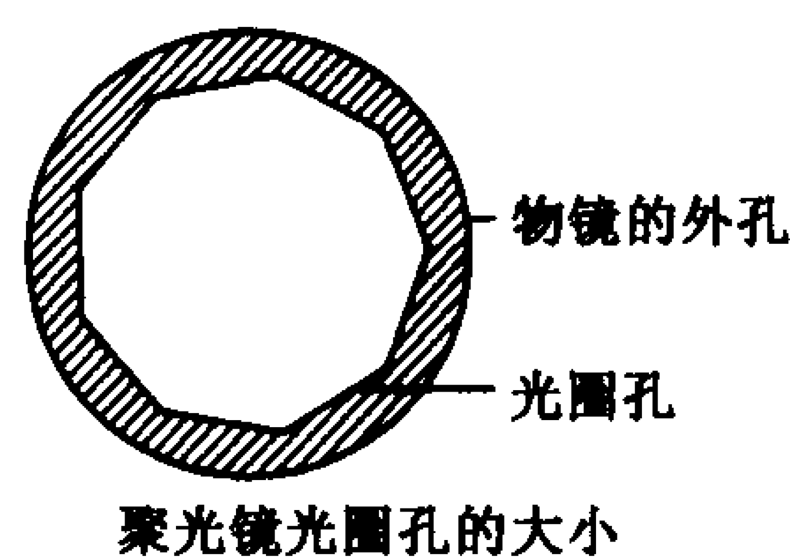


图 16-8　聚光镜光圈孔

4. 定位照明中心（对于较新型显微镜，已经有了中心定位照明系统。）

- 为了聚焦和定位照明中心，卸去散射体。
- 关掉聚光镜的光圈。
- 使用滤片（ND 或蓝色滤片）作为镜子观察聚光镜外灯丝的像（对于反射光系统，卸去目镜部分，观察物镜后面的像）。
- 聚焦灯丝的像，使之变得强烈。
- 照明中心化和聚焦后，装上散射体。

5. 控制对比和视野深度

- 卸下目镜部分，观看物镜背面的管子。

- 调节光圈，使它正好在开孔内（约小于整个光圈的25%）

尽快使用，一旦显微镜调节好尽快观察样本。

1. 拿掉罩子，放在一边。
2. 打开显微镜电源，将光源控制钮朝最大方向调节时光线变亮。
3. 将物镜转开。
4. 将玻片放在平台上。
5. 用10×或20×物镜聚焦。
6. 调换更大放大倍数的物镜。

制片和染色

你必须总是准备好你要显微观察的有机体的材料。

组织培养的细胞通常可以用倒置显微镜原位观察，对于其他的培养物，必须将培养物转移到玻片上，这样既可以观察湿标本，也可以固定和染色后观察。

湿标本允许活体观察，染色后提供的是细胞或细菌内部的结构或化学特性。

湿标本是悬浮的细胞，放置在玻片上，用盖玻片覆盖，细胞被直接观察，不需要固定或染色，是一种快速的方法，也是最简单的监控培养物生长情况和密度的方法。

制作细胞涂片

在染色和固定细胞或细菌以前，细胞悬浮液应该均匀地涂在玻片上，可以加一滴悬浮很好的细胞液到玻片上，用环或移液头涂布，但均匀涂布很难，最好的方法是用细胞
旋转器（一个小离心机）把细胞在显微镜玻片上铺平。涂片也可以用另一个玻片协助完成。

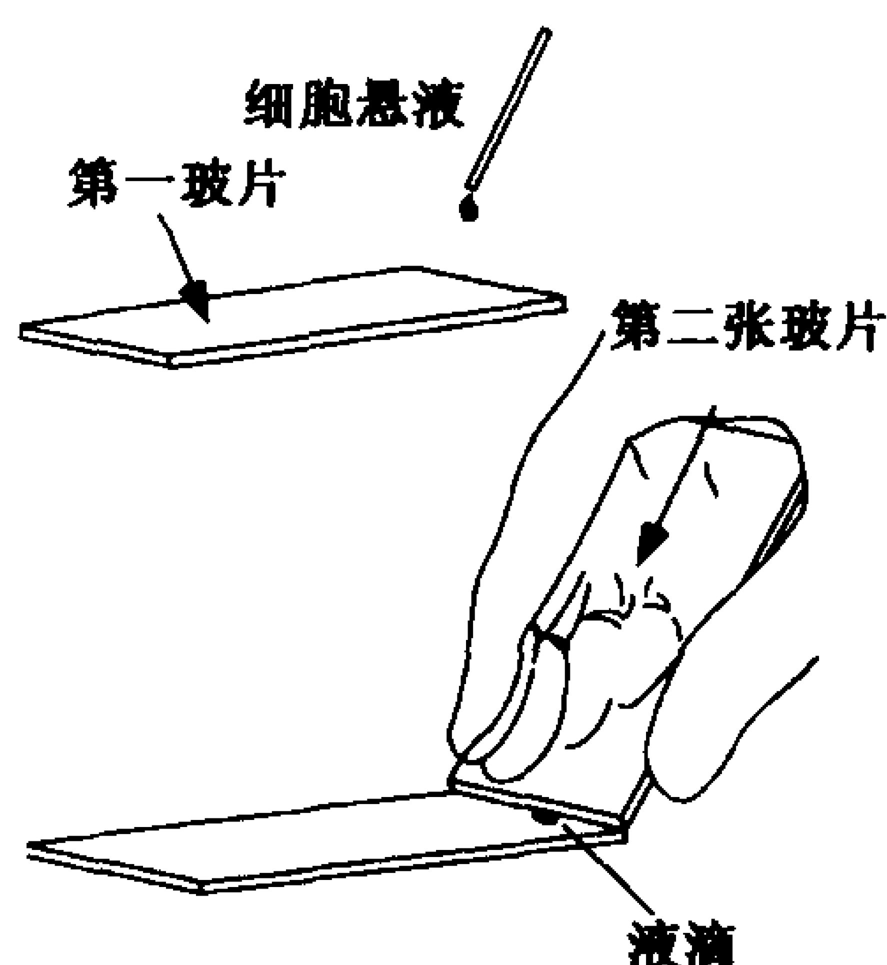
> 拿冰箱中过期的血清用做练习，可以用一滴血清悬浮细胞，也可以向细胞悬液中加一滴血清。

步骤

1. 滴一滴细胞或细菌悬液到显微玻片的一端，如果细胞悬液中含有血清，涂片最好做。
2. 取另一张玻片，对着第一张玻片放到细胞悬液的一端，让细胞悬液沿着第二张玻片的边缘扩散。
3. 沿着第一张玻片的长边向前推动第二张玻片，保持45°角推动。
4. 将第二张玻片丢掉，固定和染色前让涂片晾干。

固定标本

多数染色和操作过程有自己需要的固定剂，如甲醇可以用于固定细胞和细菌，戊二醛和多聚甲醛作为蛋白质交联剂，在没有其他任何提示时，用甲醇。



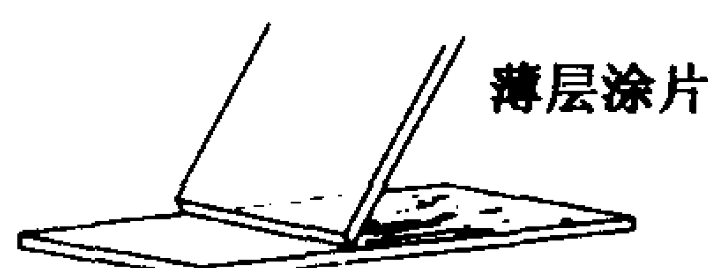


图 16-9　用玻片制做细胞涂片

步骤

1. 用甲醇覆盖细胞区域，最好在小缸（科普林缸）或大口烧杯中做。如果没有缸，将甲醇移液到玻片上。使用新鲜的无水甲醇，因为甲醇能够吸收空气中的水分，这样会阻止染色。
2. 5min 后除去甲醇。
3. 用新鲜甲醇替换，5min 后除去。
4. 空气干燥。

染色标本

- 染色可以增加细胞的对比度，在观察培养物时至少有一种染色，染色会给你的培养物或实验提供尽可能多的信息。有一些用于特殊器官细胞的染色方法可以与特殊的染色化学试剂起反应。
- 革兰氏染色试剂盒适用于细菌染色，方便使用，可以放置数月。虽然由于形态学的问题，染料难以穿透坚硬的酵母细胞壁，但革兰氏染色中的结晶紫可以用于酵母染色。Auromine 也可以染色多数的细菌，但不能像革兰氏染色那样能够区分细菌。
- 赖特氏染色和吉姆莎染色被用于区分血细胞的类型，但它们可以染色多数的真核细胞，使用极其方便。
- 甲基蓝能够染色一切，但不能从细胞或细菌中得到任何细节。

摄　影

数据必须被记录，除非你使用显微镜是进行常规的形态学观察或污染检测，否则要记录下你观察到的内容。同时，在照片上计数或测定样本（可能借助计算机的帮助）通常比在显微镜上做要容易。

数码或胶片摄影？多数装备好的实验室既有传统的胶片也有数码的显微摄影设施。

- 胶片摄影需要了解不同种类的胶片和滤色片以及镜头光圈、快门速度和景深之间的关系。虽然多数实验室有很好的摄影标准操作建议，但是多数实验室成员照章办事而不进行深入理解。胶片摄影的分辨率极好，开始需要的设备也相对便宜，但对胶片的加工花费会增加。
- 数码摄影的优势是容易抓住影像和易于对影像进行处理和转移。数码摄影的建立在新实验室通常是第一选择。多数的数码相机不需要或需要很少的摄影专业技能，它们一般通过相连的计算机上的软件控制。光学显微镜中看到的影像数字化使得要增强目标特征、提取信息或修饰影像变得更加容易，例如，背景“噪音”可以被消除。另一个优点是影像立即可以被看到。用于数字影像获取和处理的软件和设备对于非常特别的应用则变得倾向于特殊。

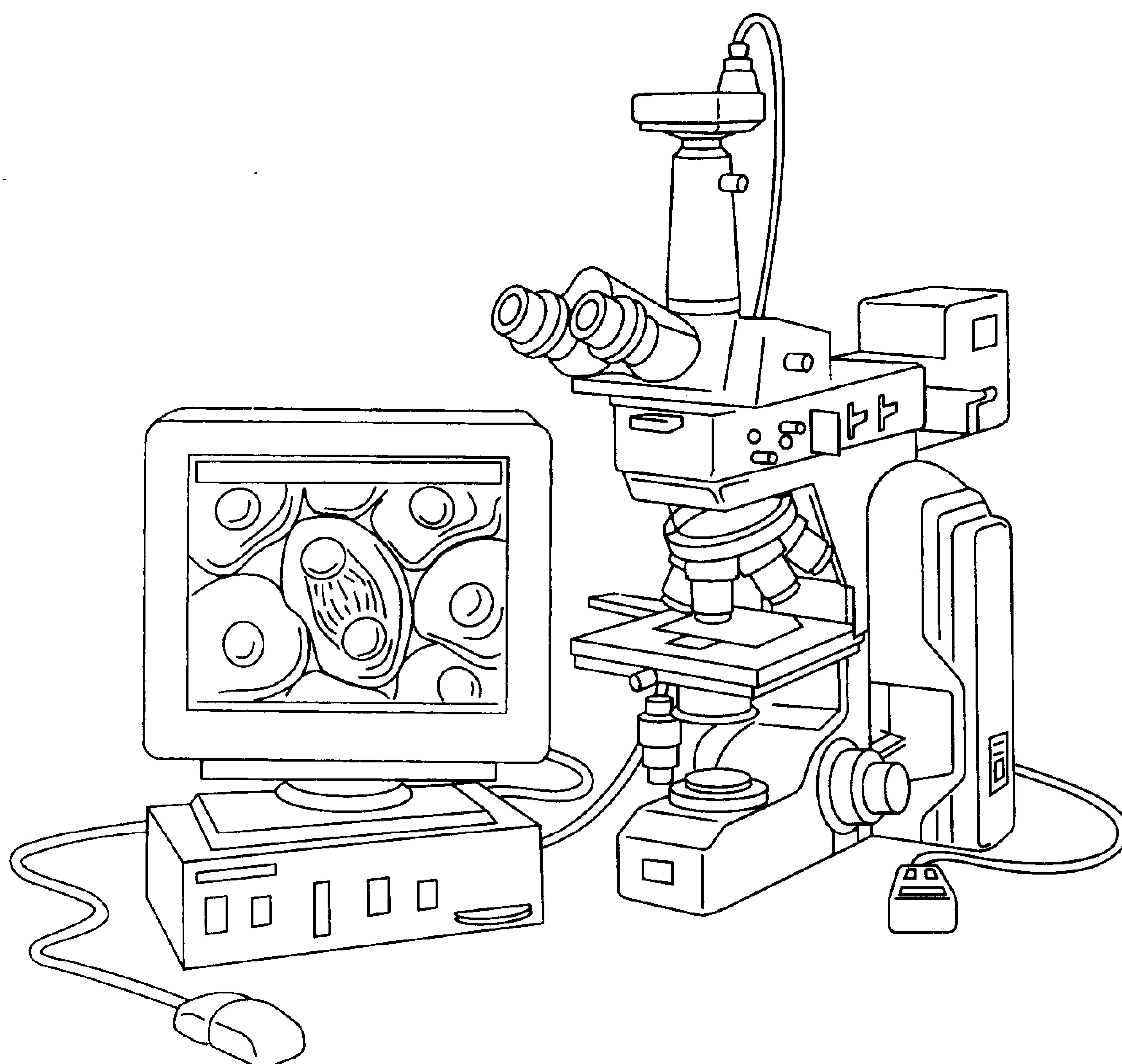


图 16-10 用于数字显微镜的光学显微镜

胶片摄影的步骤

1. 确认显微镜已经调节到最大照明和分辨率
2. 安装目镜探视镜
 - 平台上不放样本，十字线聚焦，卸下目镜和聚焦器，顺时针缓慢旋转。
 - 重新检查。
3. 聚焦样本
 - 放一个干净的样本在玻片上。
 - 聚焦样本，调整目标。
 - 通过目镜探视器重新检查聚焦，记得总是进行一次最后聚焦。
4. 加上电压和滤色片

   自动系统：按照 ASA（美国标准化协会）进行，有些显微镜可能不需要这些。

   手动系统：检查生产商所建议的胶片、滤色片和电压设置。
5. 设定曝光

   自动系统：根据 ASA 和光源，一旦样本能够看到，曝光时间就已经决定，当曝光足

够时，快门会被关上。

手动系统：因为暗与明的比例关系，样本的差异极大，对不同的光条件进行补偿。在明视野下拍照，曝光调节通常设置在 ± 1/3，而暗视野和荧光曝光调节的设置通常在 - 1 和 - 2 之间。使用光度计决定曝光，经验只是保证曝光设置正确的一种途径。

6. 调节光圈和视野

- 重新调节聚光镜上的光圈孔，获得样本最好的影像。
- 关闭光圈孔到约为满孔的 75%，进一步关小可以获得更大的对比度和视野深度，但损失了分辨率。
- 设置视野光圈恰好在相机面十字的外围。
- 再检查一次。
- 按下曝光按钮曝光胶片。

使用什么样的胶片?

尽量使用柯达胶片，这种胶片可靠。当然，可以问那些给你展示显微镜和照相系统的人，请他们为你推荐胶片。老的系统照明较弱，没有自动曝光计，更多地依赖于胶片的选择，多数影像的操作是由胶片和滤色片的选择实现的。现在，要捕捉看到的影像变得更为容易，你不必担心日光颜色、滤色片和上下停顿的影响。

规格：35 mm 胶片

黑白胶片

- 黑白胶片可以用于黑白样本的拍照。黑白胶片比彩色胶片便宜也能给出足够多的信息，如果色彩不是问题，使用黑白胶片。
- 柯达技术全景胶片（TP）是高对比度胶片，对显微拍照适合，尤其是干涉和相差显微拍照。
- 柯达 T-MAX 400 专业胶片（TMY）比 TP 更快，适合暗淡照明物体的拍摄，使用于荧光或暗视野显微拍照，也适合活的生物样本的光学显微镜拍照。

彩色幻灯片胶片

- 使用彩色幻灯片胶片用于陈述或学术报告。
- 柯达 Ektachrome 64T 专业胶片（EPY），适合钨灯 - 卤素灯或普通钨灯照明的拍照，对染色组织的亮视野显微镜极为适合。
- 柯达 Ektachrome 160T 专业胶片（EPT），用于钨灯照明。
- 柯达 Ektachrome P1600 专业胶片（EPH），为低光拍照设计，用于拍摄单一标记的或双标记的荧光样本。

> ISO（国际标准化组织）或 EI 给出了柯达胶片的速度匹配值，数值越高，需要的光越少。多数胶片都有一个 ISO 的匹配，当测定曝光的标准条件不适合胶片时使用 EI 匹配，数值比较起来非常近似。

彩色印刷胶片

- 印刷胶片常用于发表图片，印刷照片也可由幻灯片胶片获得，但会损失一些质量。
- 柯达 Pro 100 专业胶片（PRN）（400 或 1000，适用于较暗光线的拍照）。

滤色片

滤色片用于增强或轻微改变胶片内在色彩，多数滤色片的作用根据个人偏好。

- 中密度的滤色片吸收的几乎仅是可见光，因而可以在不改变颜色的情况下降低光强度。
- 日光型蓝色滤片吸收显微镜灯的黄色至红色波长的光，给出的光的色彩适用于日光型的胶片。
- 钨灯色彩的胶片通常不需要滤色片。
- 绿色滤色片对黑白胶片给出了附加的对比，能够用于黑白染色样本的拍照。

对于日光型胶片的色彩和电压应该设定到胶片规范值使色彩平衡。

储存

胶片，尤其是专业胶片，应该储存在55°F以下，胶片的包装在打开前必须预热到室温。胶片可以冷藏保存，不需要花几个小时的时间等待胶片预热到室温。

处理

虽然彩色胶片在冲洗前基本没有变化，但许多实验室自己冲洗黑白胶片，将负片送去打印。冲洗胶片简单，但容易冲洗不均衡，确认按照要求冲洗。

如何鉴别好照片

- 是否显示出了你的实验点？
- 是否说明了问题或者记录了最小点？
- 完美吗？干净吗？

荧光显微镜

荧光是一种发光类型，其中分子吸收光后会有短期的光散发，散发荧光的波长通常比吸收（或激发的）光的波长要长（这种现象叫 Stoke 定律），这种差别可以进一步通过使用滤色片增强而实现大的对比度。使用不同的荧光染料可以在同一个标本上观察到不止一种标记的分子。

☆ 应用

- 荧光显微镜的主要应用是免疫荧光。标记荧光物质的抗体与特异抗原结合，荧光标记就可以观察到抗原的存在、位置和数量。
- 抗体以外的分子也可以被荧光物质耦联，其应用决定于是什么分子。另外，活细胞也可以用荧光分子标记，例如，生理学过程的变化如 pH、钙离子、膜电势和膜上脂质分子的侧向运动可以用荧光分子标记和显微镜进行研究。

免疫荧光可以是直接的也可以是间接的，直接荧光是将特异抗体与荧光染料交联后用于染色标本，间接荧光中特异抗体与抗原结合，结合的抗体自身被荧光耦联的抗体所识别。

- 标本可以用多种颜色染色，因此可以观察到两种或三种不同颜色的分子标记。多种颜色染色可能会带来背景问题，其中一种染色可能在另一种特别荧光染料中消失。多数实验室仅用荧光素作为绿色标记、玫瑰精作为红色标记，但有很多很多选择可以提供，分子探针手册对荧光选择作出了很好的讨论。

☆ **荧光显微镜**

- 荧光显微镜是一种复合光学显微镜，改进的是落射荧光或附带光源，物镜系统包括聚光镜和物镜两个部分，含有彩色光束分流栅将激发光从发射光中分开。有些荧光显微镜将明视野显微镜与滤色片结合起来，但这不能将信号区别开来。
- 滤色片，通常是干涉滤色片，提供了系统的特殊性，每种荧光染料需要一套激发和散发滤色片来增强其特别的信号，由于价格问题多数实验室仅仅只有数量不多的几套。
- 光源是高压蒸气灯，用汞或氙气填充，对于不同的波长有不同的光源推荐。
- 多数显微镜允许调节亮视野或相，因此非荧光的样本可以与荧光的样本相比较。
- 荧光显微镜上常见有照相机。使用最好的胶片需要很少的光线就可拍摄荧光照片。

☆ **技巧**

- 保护光源。荧光显微镜的照明光源比常规的贵，而且寿命短，应避免频繁开关，保持光源开着。多数灯在使用前需要预热，通常会有一张签名纸或记录灯使用情况的本子。
- 用于荧光显微镜的滤色片与用于特定波长产生荧光光源的滤色片不同。
- 除了用于产生特定波长的荧光不同，荧光显微镜使用的滤色片也不同。
- 拍照时通常应该行动很快，因为荧光样本会褪去荧光（激发过程荧光会降低），在样品黏附介质中加入氧自由基清除剂如 DABCO（二氨基二环辛烷）对减少褪光有效。
- 在决定染色前先核实你有什么滤色片。买染料当然比买滤色片便宜，但有可能用某种滤色片只能进行特定的染色，那时你将受到更多限制。
- 样本的准备易受人为影响。固定和染色虽然简单，但有些小细节如固定剂的类型和温度、标本染色的容器可能是造成结构差异的主要原因。每个细胞样本和每种抗体都会有它们特别的需要，请教那些不仅做过免疫荧光实验，而且做过同种细胞，最好是同种抗体的人。

公共仪器设备

特定的显微镜系统，如电子显微镜、共聚焦显微镜和荧光激活的细胞分检器（FACS），购买和维护十分昂贵，对于多数研究人员是负担不起的。这些仪器多数在公用仪器设备处能够见到，意味着是系、单位或课题组共同出资购买。

> 在计划做实验的前几周就与显微镜管理人员联系，看看什么时候他能做你的样品，以及样品该如何处理。

这样做的好处是个别研究人员在没有巨大支出的前提下进行理论或实践研究，公用仪器室通常有一个高度技术性的专职人员负责显微镜，他可以帮助处理一些小的问题，并能帮助你理解如何操作。

缺点是可能等相当长的一段时间。这些仪器的运转方式各异，你可能需要做从非固定的样本到实际运行实验的任何事情。

清洁玻片和盖玻片

玻片和盖玻片上要黏附观察的细胞必须十分干净。为了荧光染色和处理细胞，细胞必须被黏附到玻片或盖玻片上（通常在玻片上）：灰尘或油脂会干扰细胞黏附以及一些细胞需要由黏附驱动包埋。另外，脏的玻片会引起染色假象，严重干扰细胞荧光信号的显像。

过程

清洁玻片

1. 用液体去污剂清洗玻片（25mm×75mm 预洗过的玻片）几分钟。
2. 用水冲洗玻片 30 分钟，干燥。

用酸清洗盖玻片

1. 在通风橱内用玻璃烧杯配制 300mL 酸混合液（2 份硝酸:1 份盐酸），溶液呈橙红色。
2. 放 10 oz. 的 #1.5 盖玻片到酸溶液中，每次放一些使它们分开而不被打碎，间或搅动浸泡液 2 小时。
3. 小心倒去酸液，用废物接收容器回收。
4. 用流动的自来水彻底冲洗盖玻片，至所冲洗水 pH5.5～6.0。
5. 将盖玻片存放在有盖的 70% 乙醇的容器中。
6. 使用前晾干盖玻片。

用碱清洗盖玻片

1. 将盖玻片放在 2N 的 NaOH 中浸泡 2 小时。
2. 用去离子水彻底冲洗。
3. 按酸清洗的第 5 和第 6 步进行。

清洗后的玻片和盖玻片可用于涂片细胞或用溶液处理后（如明胶、氨基烷基硅烷或聚 L-赖氨酸）以促进细胞和组织的黏附。

（王维荣）

参 考 文 献

Fisher Scientific. FAQ-Microscopy. http://www.fisher1.com/faq/micro.html

Freshney R.I. 2000. *Culture of animal cells. A manual of basic technique,* 4th edition. Wiley-Liss, New York.

Harlow E. and Lane D. 1999. *Using antibodies: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Haugland R.P. 1996. *Handbook of fluorescent probes and research chemicals,* 6th edition.

Molecular Probes, Eugene, Oregon.
Heidcamp W.H. 1995. *Cell biology laboratory manual.* Gustavus Adolphus College, St. Peter, Minnesota.
http://www.gustavus.edu/~cellab/index-1.html
How to use a microscope and take a photomicrograph. Nikon Inc., Instrument Group, Melville, New York
For film and filter types, setting up for photomicrography, setting up a microscope.
Interactive Java tutorials. 2003. Nikon Microscopy U.
http://www.microscopyu.com/tutorials/java/index.html
Interactive instruction for microscopy and imaging.
Lacey A.J., ed. 1989. *Light microscopy in biology. A practical approach.* IRL Press at Oxford University Press, New York.
Matsumoto B., ed. 1993. *Cell biological applications of confocal microscopy. Methods Cell Biology,* Volume 38. Academic Press, New York.
Handbook of Fluorescent Probes and Research Products. 2004. Molecular Probes.
http:// www.probes.com/handbook/
Murphy D.B. 2001. *Fundamentals of light microscopy and electronic imaging.* Wiley-Liss, New York.
Murray R.G.E. and Robinow C.F. 1994. Light microscopy. In *Methods for general and molecular bacteriology* (ed. P. Gerhardt et al.), Chapter 1, pp. 7–20. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
Omega Optical
http://www.omegafilters.com/
Filters for Nikon, Zeiss, Leitz, and Olympus.
Pawley J.B., ed. 1995. *Handbook of biological confocal microscopy,* 2nd edition. Plenum Press, New York.
For the advanced user.
Rawlins D.J. 1992. *Light microscopy.* BIOS Scientific Publishers, Oxford.
Rubbi C.P. 1994. *Light microscopy. Essential data.* John Wiley and Sons, Chichester, England.
Russ J.C. 2002. *The image processing handbook,* 4th edition. CRC Press, Boca Raton.
Sheppard C.J.R., Hotton D.M, and Shotton D. 1997. *Confocal laser scanning microscopy.* Bios Scientific Pub Ltd., Abingdon, England.
Spector D.L., Goldman R.D., and Leinwand L.A. 1998. *Cells: A laboratory manual.* Vol. III. *Subcellular localization of genes and their products,* Chap. 98. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

词汇和解释

Absorbance（吸收）：没有通过物质的光线的量。

Accession number（目录号）：个别 DNA 序列数据库提供的一种编码识别符。

Acid（酸）：能够产生质子的物质，因此带正电荷，酸溶液的 pH 小于 7。

Acrylamide（丙烯酰胺）：一种合成聚合物形成的基质，用于电泳。

Additive effect（加性效应）：处理 A 与处理 B 的作用是同样的效应，仅仅在数量上增大，说明 A 和 B 通过同样的途径作用。

Aerobe（好氧生物）：在有氧条件下生长的生物。

Aerosol（气溶胶）：一种细小的固体或液体微粒悬浮于气体分散介质中形成的溶胶。

Affinity（亲和力）：配基与受体结合的强度。

Agar（or agar agar）（琼脂）：一种复杂的多糖，用于凝胶化制备固体或半固体的微生物培养基。琼脂由约 70％的琼脂糖和 30％的琼脂果胶组成，100℃以上融化，40～50℃成冻胶。

Agarose（琼脂糖）：一种非硫酸化的线性聚合物，由互交的 D-半乳糖和 3，6-半乳糖苷残基组成，由海藻中提取广泛用于电泳。

Alkaline phosphatase（碱性磷酸酶）：一种酶，催化产色反应，用做报告基因或检测抗体结合。

Alpha particle（α 粒子）：一种放射性衰变产生的粒子，由 2 个质子和 2 个中子组成。

Amphoteric（两性物质）：能够作为酸或碱起作用。

Amplification（放大作用）：①通过抑制染色体复制的同时允许质粒继续复制而使质粒拷贝数增加；②通过染色体复制或者克隆质粒载体使基因的拷贝数增加，通常被称为基因的放大作用。

Ampoule（安瓿瓶）：一种小的玻璃或塑料瓶。

Anhydrous（无水的）：没有水，常用于描述无水结晶的固体或痕量水被除去的溶剂。

Anion（阴离子）：一种带负电的离子。

Anionic detergent（阴离子去污剂）：去污剂的疏水功能由阴离子基团来完成，如脂肪酸和十二烷基硫磺酸钠（SDS）。

Annealing（复性）：单链 DNA 结合成双链 DNA。

Anode（阳极）：可以结合阴离子的带正电荷的电极。

Antibiotic（抗生素）：能够杀死或抑制特定微生物生长的物质。

Antifungal, antimycotic（抗真菌剂、杀真菌剂）：能够杀死真菌的物质。

Antiseptic（消毒剂、防腐剂）：能杀死或抑制微生物生长但对人体无害。

Antiserum（抗血清）：含有抗体的血清。

Apoptosis（凋亡）：程序性细胞死亡。

Artifact（人为现象）：人为主观愿望操作引起的结果。

Aseptic technique（无菌技术）：无菌仪器或维持无菌培养物操作的技术。

Aspirate（吸气）：通过抽气除去液体或气体。

Assay（化验、试验）：通过实验进行鉴定、定性或定量分析。

Atomic weight，atomic mass（原子重量、原子质量）：一种元素的一个原子的平均重量，一个原子中总的质子和中子的质量。

Attenuation（减毒作用、弱化作用）：①病原物毒性减低，通常减毒的病原物仍然可以用于免疫。②在氨基酸生物合成相关酶的调控中起作用。

Autoclave（高压灭菌器）：蒸汽灭菌器。

Autoclave tape（高压灭菌胶带）：热敏感胶带，灭菌后显示"无菌"字样。

Autoradiography（放射自显影）：检测样品放射性的方法，将细胞或凝胶放到照相胶片如 X 射线胶片使胶片曝光而显影的技术。

Auxotroph（营养缺陷体）：一种需要生长因子的突变体。

Axenic（纯净的）：单一细胞类型的培养。

Bacillus（杆菌）：一种长的棒形细菌。

Background（背景）：处理与未处理比较存在的稳定水平的效应。

Bactericidal（杀菌的）：能够杀死细菌。

Bacteriostatic（抑菌的）：不杀死细菌的情况下能够抑制其生长。

Badge（携带式放射线计量仪）：携带式放射线计量仪。

Bake（烘焙）：在高温度下干燥。

Band（条带）：①凝胶电泳和染色后，个别组分或多肽呈现矩形的带；②复杂混合物分离后在梯度中显示的区域。

Basal medium（基本培养基）：不添加其他成分的培养基，可以允许多种类型的微生物生长，如营养肉汤。

Base（碱）：可以接受质子的物质，可能带负电，溶液的 pH 大于 7，Alkaline 也是碱。

Baseline（基线）：用于作为参照、负处理或负操作的一条线。

Becquerel（Bq）（贝克）：1 贝克 = 每秒钟衰变一次，放射性活度的标准单位。

Bench paper（实验台吸水纸）：背面是塑料的吸水纸，可以是一匝或一卷。

Beta particle（β 粒子）：放射衰变产生的粒子，相当于一个电子。

Biochemicals（生物化学物质）：生物学物质。

Biohazard（生物危害）：一种潜在的有害生物物质，对于丢弃意味着有活的有机体或者接触过活有机体的物品。

Biosafty cabinet（biohazard cabinet）（生物安全橱柜）：罩或橱柜设施，保护操作人员不受操作物质的伤害，根据有机体危害水平，有三种生物安全橱柜。

Blank（空白）：参照溶液，在质谱中，参照溶液包含了除检测物质以外的所有成分。

Bleaching（fading）（漂白、褪色）：激发过程荧光减弱。

Blotting（印迹）：DNA、RNA 或蛋白质由凝胶到膜（尼龙膜或纤维素膜）的转移。

Blue-white selection（蓝白斑筛选）：颜色筛选系统，用于判定质粒是否携带插入片段，外源基因插入到报告基因 *Lac Z*（编码 β-半乳糖苷酶），使其不能产生 β-半乳糖苷酶，因而转化的菌落是白色的，而没有带插入片段的克隆可以产生 β-半乳糖苷酶，水解

发色底物 X-gal，长出的菌落是蓝色的。

Blunt ends（平端、平头末端）：DNA 分子的末端完全配对。

Bomb（气穴弹）：氮气气穴弹，通过氮气气穴破碎生物物质。

Box（盒）：凝胶电泳的容器。

Boyle's Law（波义耳定律）：气体的体积与压力成反比。

Bremsstrablung（韧致辐射）：当 β 射线碰撞产生的辐射，速度被固体物质减慢。

Brownian（salutary）motion（布朗运动、有益运动）：不会丧失运动性，悬液中微生物或细胞进行的小的前后运动或圆周运动。

Brushes（电刷）：马达的一部分，完成电路循环。在离心机中电刷常易磨损，需要定期更换。

Budding（出芽）：①无性繁殖（通常是酵母），开始于母细胞的突起，生长后成为一个子细胞；②通过动物细胞的细胞膜释放一个包膜的病毒。

Buffer（缓冲液）：加入少量酸或碱后 pH 值不发生改变的溶液。

Calibrate（校准）：检查、调节或定量测定仪器的系统标准化。

Capillary action（毛细作用）：液体沿细管或纤维的自发运动，由黏着力、黏结力以及表面张力所决定。

Carcinogen（致瘤的）：能引起肿瘤发生起始的物质，通常为诱变剂。

Cathode（负电极）：可以结合阳离子的带负电的电极。

Cation（阳离子）：带正电荷的离子。

Causality（因果关系）：产生结果的原因和结果之间的关系。

Caustic（腐蚀性的）：任何强碱物质引起活的生物组织的腐蚀或刺激。

Cell wall（细胞壁）：细胞膜外的层状结构，支持和保护细胞膜并维持细胞形状。

Chaotropic agent（离液剂）：可以裂解细胞的一种化学物质或混合物。

Chase（追加、追踪）：对处理进行一段非处理期的跟踪，分析处理中活性物质随时间的效应变化。

Chelate（螯合）：以多价配体结合金属离子，通常用于有效降低离子参与反应。

Chemical（化学物质）：化学反应过程中产生或使用的物质。

Chemical reactivity（化学反应能力）：一种物质发生化学变化的能力，或者引起爆炸危害释放有毒烟雾的能力。

Chemiluminescence（化学发光）：化学反应过程中产生了发光副产物。

Chi square（卡方）：理论上样本分布，用于检验一个样本是否取自于给定的群体。

Chromatography（色谱、层析）：样品随着溶液经过一个非移动吸附剂将各组分进行分离，通过不同吸附和洗脱分离出混合物的组分。

Chromogenic（发色的）：能够产生色彩改变。

Clone（克隆）：①细胞都来自于一个单细胞；②一定拷贝数的 DNA 片段通过噬菌体或质粒复制。

Cloning vector（克隆载体）：一个 DNA 分子可以引起外源 DNA 片段的复制。

Cold（非标记的、不带放射性的）：非放射性的俚语。

Colony（菌落、集落）：固体培养基上肉眼可见的细菌细胞的克隆。

Colony forming unit (cfu) [集（菌）落形成单位]：琼脂平板上能够形成一个集（菌）落的任何实体（通常是一个可养活的单细胞）。

Comb（胶梳）：用于形成凝胶孔的塑料片。

Competence（感受态）：细胞能够接纳外源 DNA 并将其转化的能力。

Complex buffer（复合缓冲液）：含有不止一种成分的缓冲液。

Complex medium（复合培养基）：一类不清楚精确化学成分的培养基，也称为不明确的培养基。

Concatemer（多联体、串联体）：一种 DNA 分子，由两个或更多个单独的分子串联成的长线性结构，通常是人为克隆。

Consensus sequence（共有序列）：核酸序列中碱基出现的位置与许多实验测定的序列比较其出现的位置是普遍发现的共同位置。

Consistent（一致的）：后继的结果与起初的相同。

Constitutive（组成型）：恒定出现，无须刺激。

Contact inhibition（接触抑制）：与其他细胞或集落的空间接触抑制细胞或集落的继续生长和分裂。

Contamination（污染）：在你不希望长出生物的地方长出了其他生物。

Contrast（对比度）：显微镜中亮和暗因素的放大。

Control（对照）：能够与实验变量进行比较的标准。

Cooling trap (vapor trap)（冷凝器）：用于阻止挥发性物质被吸到真空泵中的器具。

Copy number（拷贝数）：①每个细胞中质粒的拷贝数；②一个基因的拷贝数。

Correlation（相关性）：两个实体之间的一致性。

Correlation coefficient（相关系数）：描述两种作用之间线性关系强弱的量。

Corrosive（腐蚀）：一种化学物质与接触部位发生化学反应引起组织的破坏。

Cosmid（黏粒）：用于克隆大片段 DNA 的克隆载体。

Counts per minute (cpm)（每分钟计数）：每分钟检测到的 β 粒子的数目，cpm = dpm × 计数设备的效率。

Culture [培养（物）]：生长在实验室培养基上的一株或一种有机体。

Curie (Ci)（居里）：一种仍在使用的放射性单位，计量放射性衰变的数量，$1\ Ci = 2.22 \times 10^{12}$ dpm。

Cuvette（比色皿）：用于分光光度计中盛放样品的小容器。

Cytokine（细胞因子）：一类小的分泌多肽，通常不是淋巴细胞产生，对炎症、趋化性、血管生成和 T 细胞增加等有多种效应。

Dalton（道尔顿）：分子质量的单位，几乎等于一个氢原子的质量。

Data sheet（数据表）：物质安全性数据表。

Decay（衰变）：放射性原子的裂变。

Deductive thought（演绎思维）：提出假说，收集证据支持或否定假说。

Defined medium（确定成分培养基）：已知精确化学成分量的培养基。

Degeneracy（简并性）：由于遗传密码的关系，可以不止一种密码编码同一个氨基酸。

Degrees of freedom（自由度）：能够维持系统原有的相数但可以独立改变的变量，例如，

如果仅仅估计群体的标准偏差，那么自由度可以少于样本数。

Deionization（去离子作用）：通过离子交换树脂去除溶液中的离子杂质。

Deletion（删除）：去除一个基因的一部分。

Denaturation［变性（作用）］：大分子的不可逆破坏，如蛋白质的热变性。

Denature（变性）：通过物理或化学的方法破坏蛋白质的二级或三级结构，通常会引起生物活性的丧失。

Densitometer（光密度计）：测定光线通过固体介质（如X射线胶片）发射量的仪器，因而可以定量胶片上的信号。

Depth of field（景深）：物体呈现最清晰状态时沿光轴的距离。

Desiccation［干燥（作用）］：干燥。

Detergent（去污剂）：表面活性分子，带有极性（水溶、亲水）和非极性（疏水）区域，可以强烈结合疏水分子或带有水溶性分子结构的分子，如SDS（十二烷基硫酸钠）、脂肪酸盐、曲拉通家族和辛基糖苷。

Deuterium（氘）：氢原子的同位素，原子核带一个中子。

Dewar flask（德瓦瓶）：用于运输和灌注液氮的容器。

Dialysis（透析）：溶液中的离子或小分子物质透过半透膜而大分子保留在其中的过程。

Differential medium（鉴别培养基）：根据微生物对培养基中特定成分发生化学反应的特性，用于鉴别不同微生物类型的培养基。

Dilution（稀释）：一种溶剂加入到另一种溶液或混合物中以降低溶质或化合物的浓度。

Dimer（二聚体）：由两个独立亚基结合形成的分子。

Discontinuous electrophoresis（disc electrophoresis）（不连续电泳）（圆盘电泳）：一种聚丙烯酰胺凝胶电泳，使用两种不同浓度的聚丙烯酰胺凝胶，较低浓度的凝胶在较高浓度的凝胶上面起浓缩作用，实现更好分辨的条带。

Disinfectant（消毒剂）：一种能够杀死微生物但可能对人体组织有害的制剂。

Disintegrations per minute（dpm）（每分钟衰变次数）：放射性元素每分钟原子衰变的次数。

Distillation（蒸馏）：加热煮沸液体和浓缩蒸发以达到去除杂质或分离液体混合物成分的目的。

Domain（结构域）：有明显功能的蛋白质区域。

Dominant negative（显性阴性的）：一个突变基因的表达阻抑了其非突变基因的活性。

Dose-response（剂量效应）：一个物质的效应范围因无效应剂量、最低效应剂量、最大效应剂量和毒性效应计量而不同。

Double-blind study（双盲试验）：用于检测物质或药物效价的实验，实验中给药者和被给药者都不知道实验组进行的什么处理。

Doubling time（倍增时间）：一个群体数量增加一倍需要的时间，也称世代时间。

Download（下载）：通过网络得到一个文件。

Downstream position（下游位置）：DNA或RNA分子上给定位置的3′核酸序列。

Dry ice（干冰）：冷冻的二氧化碳，因为其升华（直接由固体变为气体而不经过液体）特性被称为干冰。

Dry run（演习）：缺少一种或多种成分情况下做的实验。

Electroelution（电洗脱）：用电流将一种基质中的物质"洗脱"出来。

Electrolyte（电解质）：一种物质在水中被解离形成离子，增加溶液的导电能力。

Electron volt（eV）（电子伏特）：电子沿着1伏特电势梯度获得的能量，$1eV = 1.6 \times 10^{12}$ erg（尔格），$1mV = 10^{6}eV$。

Electronic bulletin board（电子公告板）：万维网上使用者用于发送或答复通知的位置。

Electrophoresis（电泳）：根据物质分子在电场中的移动率来进行物质分离的方法，高分辨的电泳技术通常使用凝胶支持介质，如琼脂糖或聚丙烯酰胺。

Emulsion（乳液）：一种由两种不相溶液体（如水和油）组成的混合物，其中的一种以微小颗粒的形式存在于另一种之中。

Enrichment culture（富集培养基）：使用选择培养基和培养条件从自然界直接分离微生物。

Enteric bacteria（肠道细菌）：一大类革兰氏阴性的棒状细菌，它们以兼性的需氧代谢为特征，多数存在于动物的肠道内。

Enzyme-linked immunoabsorbent assay（ELISA）（酶联免疫吸附测定）（ELISA）：一种免疫实验方法，使用特异抗体检测抗原或抗体，含有抗体的复合物通过酶偶连到抗体上来显现，加入底物到酶-抗体-抗原复合物中可以显示出有色产物。

Epillumination（落射照明）：一种照明方式，照明的光线从物镜照射到样本，物镜既是聚光镜也是物镜。

Epitope［（抗原）表位］：抗原的免疫决定簇。

Ethidium bromide（EtBr）（溴化乙锭）：一种荧光致癌剂，能够插入到核酸分子中，被用于染色和显现核酸。

Exponential growth（指数生长）：也称为对数生长，群体的细胞数目在一定的时间内增加一倍。

Expression（表达）：一个基因在细胞内通过产生基因产物的方式发挥作用。

Expression vector（表达载体）：一种克隆载体，含有必须的调控序列，允许克隆的基因发生转录和翻译。

Extracellular Matrix（胞外基质）：细胞外的蛋白质基质，帮助细胞黏连到可以生长的表面。

Extract（抽提）：去除某个成分：如细胞的酚抽提可以去除蛋白质。

Facultive（可选择的、兼性的）：用于描述环境因子合适的形容词，如一种兼性需氧菌通常可以在氧气存在的环境生长，也可以在无氧的条件下生长。

Fallacy（谬误）：一种错误的看法，建立在非真实和不正确原因上的观点。

Feeder layer（饲养层）：饲养细胞（通常是辐射致死过的）与需要的细胞培养物一起生长，为需要生长的细胞提供生长因子。

Fermenter（发酵罐）：一种可控环境的培养罐，能同时培养数千升培养物。

Ficoll（菲可）：一种无生物学活性的蔗糖聚合物，用于溶液增稠（如杂交混合物和梯度）。

Fix（固定）：①保护组织和细胞以便染色或其他处理；②修补，一种实验室不常见的使

用方法。

Flame（火焰）：①在网络上的个人攻击；②将玻璃移液管、烧瓶、金属转移针或环快速通过火焰。

Flammable liquid（易燃溶液）：易燃液体的燃烧点在37.8℃（100℉）以下。

Flash point（燃烧点、闪点）：液体在液面上产生足够的蒸气，与空气形成可燃混合物的最低温度。

Fluor（荧光剂）：闪烁液中的光反应试剂。

Fluorescein（荧光素）：用于为抗体标记绿色的荧光分子。

Fluorescein isocyanate（异硫氰酸荧光素）：用于标记蛋白质的由荧光素衍生而来的化学物质。

Fluorescence（荧光）：分子吸收光后被激发，发射出一个或更多的光子。一个分子吸收一种波长的光后发射出较低能量的波长更长的光。荧光检测同时需要一束激发染料分子的光和检测荧光散发的光检测仪。

Fluorecence activated cell sorter（FACS）（荧光激活细胞分选仪）：一种根据荧光分选细胞或染色体这样颗粒的仪器。

Fluorophore（荧光团）：395 nm紫外激发后荧光绿色可见光显示蛋白质像水母，与其他蛋白质连接可以作为生物学标记。

Formula weight（分子质量）：一种化学物质的摩尔质量，Na的原子量为22.98，NaCl的分子质量为58.43，22.98是Na的原子量，35.45是Cl的原子量。

Friend buffers（Friend 缓冲液）：一系列的两性离子（既带正电也带负电的离子）缓冲液，用于所有的培养和生物化学研究，如HEPES、MES、PIPES和MOPS。

G force（重力）：离心过程发挥的作用力。

G+C ratio（G+C比例）：特定生物的DNA和RNA分子中，G+C在整个核酸分子中所占的比例。

Gamma ray（γ射线）：放射性衰变中发出的高能辐射。

Gaussian distribution（normal distribution）（高斯分布）：两种可能事件出现的概率。

Geiger counter（盖革计数计）：用于测定放射性计量的设备。

Gel（凝胶）：一种无活性的聚合物，通常由琼脂糖和聚丙烯酰胺制成，用于大分子的分离，如核酸和蛋白质的电泳。

Gelatin（明胶）：由动物结缔组织中提取的一类蛋白质。

Gene disruption（基因破坏）：使用体外或体内重组将一个易选择的基因替代野生型基因。

Generation time（世代时间）：群体数量增加一倍需要的时间，也称倍增时间。

Gopher（Gopher 服务器）：菜单驱动的因特网络信息系统，由个人服务器发送的文件组成。

Gram negative（革兰氏阴性）：革兰氏染色显示出不同细菌株，革兰氏阴性细胞在乙醇处理后失去主染色，保留粉红色的对比染色。

Gram positive（革兰氏阳性）：革兰氏染色显示出不同细菌株，革兰氏阳性细胞染色后即使用乙醇处理仍然保留紫红色的主染色。

Gram's stain（革兰氏染色）：一种可以将细菌分成两大类的染色方法，染色后用有机溶剂如乙醇脱色，保留结晶紫颜色的为革兰氏阳性菌，反之为革兰氏阴性菌。

Growth curve（生长曲线）：细胞数目随时间变化的曲线。

Growth rate（生长速率）：生长的速率，通常表达为世代时间。

Half-life（半衰期）：样品中放射性丢失一半所用的时间。

Heteroduplex（异源双链体）：双链 DNA 分子中，两条链来源不同，但相关。

High-throught（高通量）：自动化的大规模分析。

Hood（罩）：生物安全箱或安全橱。

Horseradish peroxidase（HRP）（辣根过氧化物酶）：一种分离于辣根植物的过氧化物酶，用于标记蛋白质和核酸，被标记的分子与过氧化物酶相连，混合物中加入底物，底物被氧化后从无色转变为有色产物。

Hot（热点）：①同位素标记的；②重点和偏色的。

Hot room（热房）：进行同位素操作的房间或区域。

Hybridization（杂交）：两条不同来源的核酸链通过碱基互补配对形成自然或人工的双链核酸分子结构。

Hybridoma（杂交瘤）：无限增殖细胞与 B 淋巴细胞融合形成一个无限增殖的淋巴细胞，可以产生单克隆抗体。

Hydrophilic（亲水的）：倾向于与水结合或溶解于水。

Hydrophobic（疏水的）：倾向于不与水结合或不溶于水。

Hygroscopic（吸湿的）：由空气中吸收水分。

Immobilized enzyme（固定化酶）：酶被连接到固体介质上，底物通过时被转化为产物。

Immunoblot（Western blot）（免疫印迹）：通过与特异抗体的互补反应在膜上检测蛋白质。

Immunoglobulin（免疫球蛋白）：抗体。

Incubate（温育、培养）：特定条件下保持样品，不一定在培养箱内。

Inducible（诱导的）：应对外界物质（诱导剂）合成特定蛋白质的能力。

Inductive thought（归纳思维）：考察收集的证据，提出一个假说来解释所有观察到的事实。

Infection（感染）：①微生物侵入身体并能生长；②实验室病毒或细菌的生长操作。

Infectious waste（感染性废物）：能够引起疾病的废物，包括致癌的病毒或病原有机体。

Inhibition（抑制）：阻止生长和功能。

In-house（内部的）：在自己单位。

Inoculating loop. inoculating needle（接种环、接种针）：用于接种微生物样品到新鲜培养基上的塑料或金属棒。

Inoculum（接种物、菌种）：用于起始微生物培养的材料。

In situ（原位）：在原来的位置（拉丁语），不改变实验材料位置的情况下进行的实验操作。

Internet（因特网）：计算机连接的网络系统。

Ion（离子）：带总净电荷的一个原子或共价结合的一对原子。

Ion exchange（离子交换）：一种离子被其他离子取代，通常是树脂表面的离子被取代。

Ionizing radiation（电离辐射）：足够能量的电磁辐射碰撞分子中的电子，形成离子。

Ionophore（离子载体）：能够引起离子跨膜渗漏的化合物。

Isoelectric point（等电点）：分子所带净电荷为零时的溶液 pH。

Isoschizomer（同裂酶）：酶切同样目标序列的限制性酶。

Isotope（同位素）：原子核中的中子数不同的原子。

Kinase（激酶）：能将磷酸加到蛋白质分子上的酶。

Knockout（敲除）：破坏一个基因使其不能转录。

Koehler illumination（库勒照明）：使复合显微镜获得最大照明的照明方式。

Label（标记）：①在一个细胞或大分子上连接一个指示分子；②在每个管子上写下内容物、日期和名字。

Laboratory Safety Department（实验室安全部门）：检查安全的部门。

Laboratory Safety Officer（实验室安全员）：实验室负责联络实验室成员和安全部门的人员。

LacZ（β 半乳糖苷酶基因）：细菌编码 β 半乳糖苷酶的基因，在真核转化中用作报告基因。

Lag phase（滞后期）：接种后群体在进入生长前的时期。

Lambda（λ、微升）：微升的缩写。

Laminar flow（层流）：无菌空气在橱柜或通风橱内工作表面的流动。

Lane（泳道）：凝胶中样品的轨道。

Leukocyte（白细胞）：通常是吞噬细胞。

Library（文库）：克隆 DNA 片段的集合，通常包括一个有机体基因组全部所含有的基因，也称为 DNA 文库、基因文库或 cDNA 文库。

Ligand（配体）：①复合物中的一种分子或金属离子；②一种特别抗体的靶子；③与受体结合的分子。

Ligase（连接酶）：将两段 DNA 连接起来的酶。

Light box（光盒）：①用于观看玻片或放射自显影的可见光；②透射仪的俚语。

Linear regression（线性回归）：如果两个作用有线性关系，一个作用的结果可以用另一个作用的结果预测。

Lipopolysaccharide（LPS）（脂多糖）：含有非常见糖和脂肪酸的复合脂结构，在革兰氏阴性细菌细胞壁的外层发现，对许多哺乳动物细胞有复杂的作用。

Listserv list（邮件清单讨论管理目录）：因特网上用于管理讨论邮件清单程序的目录。

Lowry assay（劳氏测定）：蛋白质测定方法，现在发展为 BCA 测定。

Luciferase（荧光素酶）：海洋细菌中催化发光的酶，由 *lux* 基因编码，*lux* 基因被用作转录融合部分的报告基因。

Luminescence（发光）：产生光。

Lysis（裂解）：破裂细胞，引起细胞内物质释放。

Lysogen（溶源体）：含有一个原噬菌体的原核细胞。

Macromolecule（大分子）：分子质量超过 1000da 的分子。

Maniflod（多支管）：能够通过一个控制器同时操作几个容器的移液。

Mass spectrophotometer（mass spec）（质谱分光光度计）：通过电磁场加速离子来测定离子质量的仪器。

Materials safety data sheet（MSDS）（物质安全性数据表）：生产商或分装商必须提供的每一种销售化学物质特性的信息（数据）表。

Mechanistic approach（作用途径）：设计实验研究物质如何起作用。

Medium（plural media）（培养基、复数）：配制的液体或固体物质，用于生长、保持或储存微生物或细胞。

Meniscus（弯月面）：容器中溶液与溶液/空气界面产生的曲线，测量体积时以曲线的底部为基准。

Metabolism（代谢）：一个细胞中发生的所有的化学反应，包括合成代谢和分解代谢。

Microaerophilic（微需氧的）：需要氧气，但需要氧的水平比空气中的低。

Microcarriers（微载体）：约为细胞 10 倍大小的塑料球状颗粒，可以激活细胞。随着培养基的运动，颗粒保持悬浮状态。

Microorganism（微生物）：活的有机体，肉眼不可见，包括细菌、真菌、原生动物、微小藻类和病毒。

Milli-Q（Milli-Q）：Millipore 水纯化系统的商标名，通过系列树脂和过滤器纯化的水为试剂级用水。

Miscible（易混合的）：能够以任何比例相互混溶。

Mitogen［促（细胞）分裂原］：一种可以诱导特定真核细胞有丝分裂的物质。

Mohr pipet（莫尔移液管）：测定移液管，有刻度可以用于移取一定体积的液体。

Molarity（物质的量浓度）：一升溶液中溶质的摩尔数。

Mold（霉菌）：一种丝状真菌，是组织培养常发生污染的生物。

Mole（摩尔）：一摩尔等于溶质的分子质量。

Molecular weight（分子质量）：一个分子所有原子的原子量总和。

Monoclonal antibody（单克隆抗体）：由一个单一细胞克隆产生的抗体，这种抗体有一致的结构和特异性，可以在鼠、仓鼠和老鼠体内产生，通常是鼠。

Monocyte（单核细胞）：白细胞，含许多溶酶体，可以分化为巨噬细胞。

Motility（运动性）：细胞在自身动力下运动的特性。

Mutagen（诱变剂）：引起可遗传的损害遗传的物质。

Mutant（突变）：因一种或多种突变导致种群、基因或染色体等与野生型不同的生物。

Mycoplasma（支原体）：一类细菌，无细胞壁，特别小（可能是能够自主生长的最小的有机体），最著名的特征是引起组织培养的污染。

Necrosis（坏死）：曾经被认为是非特异性细胞死亡，特征是膜损伤和细胞质改变。

Needle（针）：接种针。

Negative control（负对照）：显示没有作用情况下的实验。

Newsgroups（新闻组）：将主题贴到因特网上，与邮件清单讨论管理目录相似，但不通过电子邮件接受信息。

Nick translation（切口平移）：制备 DNA 探针的过程，DNA 片段用 DNase 处理产生单

链上的切口，接着在切口处通过 DNA 聚合酶 I 掺入标记的核苷酸。

Nonionic detergent（非离子型去污剂）：去污剂的亲水基团不带电荷，亲水性常由羟基基团承担，如曲拉通和辛基糖苷。

Nonsense mutation（无义突变）：一种突变引起密码突变但不引起编码氨基酸的突变。

Normal（当量）：一升溶液中含有的溶质摩尔质量的当量。

Normality（当量浓度）：溶液的摩尔浓度乘以溶质分子化学当量的摩尔数。

Northern blot（Northern 印迹）：一条单链的核酸分子（DNA 或 RNA）与固定在膜上的 RNA 片段杂交。

Nucleotide（核苷酸）：组成核酸的单体，由一个糖（戊糖）、一个磷酸和一个含氮碱基组成。

Null hypothesis（虚假设、解消假设）：对实验结果的假设是任意的，排除虚假设说明结果不是由于机变引起的。

Nutrient agar（营养琼脂）：添加琼脂的细菌固体营养肉汤培养基。

Nutrient broth（营养肉汤）：一种普通的基本液体培养基，由牛肉抽提物和蛋白胨组成，可允许多种生物生长。

Obligate（专性的）：形容环境因子对于生长来说一直是需要的，如专性需氧。

Oligonucleotide（寡核苷酸）：一个短的核酸分子，由机体获得或化学合成。

Open reading frame（ORF）（开放读框）：一个 DNA 的全长分子以起始密码子开始，以终止密码子结束。

Organelle（细胞器）：膜包裹的有特殊功能的细胞内小体，仅在真核生物细胞中发现。

Organic（有机的）：含碳的一大类化合物，有些含碳的小离子和含碳的化合物（如二氧化碳）通常被认为是无机的。

Osmosis［渗透（作用）］：水通过半透膜从低浓度向高浓度扩散。

Oxidation［氧化（作用）］：化合物给出电子或作为电子供体起作用的过程，物质被氧化。

P value（P 值）：字母 P 代表一种特定事件发生的可能性（probability），P 值从 0～1.0。0 表示没有发生的可能性，1.0 表示没有不发生这种事件的可能性。可能性通常认为明显的 P 值在 0.01～0.05 之间。

Palindrome［回文序列（结构）］：DNA 分子上一条链的核苷酸序列在另一条互补链上同样出现，只是方向相反。

Paradigm（范例）：思维模式完全照另一个人（或领域）进行。

Parafocal（等聚焦的）：有非常相近聚焦距离的物镜，当调换物镜透镜时几乎不要调节聚焦。

Passage［（细胞）传代］：继代培养，指将一个容器中的细胞转接到另一个容器中，通常给予营养。

Pathogenicity（致病性）：寄生物引起宿主伤害的能力。

Pellet（沉淀）：离心后在离心管底部沉积的颗粒物质或细胞。

pH（pH 值）：溶液中氢离子浓度的对数值。

Phagemid（噬菌粒）：既可以以质粒也可以以噬菌体复制的克隆载体。

Phenomenology（现象学）：没有解剖的描述，是进行机理研究前的必须过程。
Phenotypic drift（表型漂变）：一种生物随时间有明显变化的倾向。
Phosphatase（磷酸酯酶）：将磷酸从蛋白质分子上除去的酶。
Photobleaching（光漂白）：光使荧光分子的激发衰减的现象。
Photon（光子）：由电磁辐射一个量子的能量。
Phototube detector（光电管检测器）：将光能转变为化学能。
Pig（铅盒）：用铅铸成的放射性同位素物质的最外层保护容器。
Pilot（计划）：进一步实验的假设性模型。
Plaque（噬菌斑）：细胞菌苔上病毒感染引起的细胞裂解或细胞抑制的局部区域。
Plasma（血浆）：血液的非细胞部分。
Plasma cell（浆细胞）：最终分化为可以产生抗体的B淋巴细胞。
Plasmid（质粒）：染色体外的遗传因子，对生长为非必须，没有胞外形式。
Plate（平板）：涂布分裂后细胞的容器。
Plates（平板）：用于盛细菌生长的固体培养基的培养皿。
Plating efficiency（平板效率）：能够形成集落的细胞百分数，有时也可以表示种子率（生长并可收获作为种子的细胞百分数）。
Polymerase chain reaction（PCR）（聚合酶链式反应）：体外扩增DNA的方法，用与目标基因核苷酸序列互补的寡核苷酸引物和DNA聚合酶复制目的序列。
Precipitation（沉淀）：①通常通过结合阳离子或阴离子形成不溶解的离子化合物来实现在溶液中形成固体的过程；②抗体与可溶性抗原反应产生可见抗体-抗原复合物的现象。
Prehybridization（prehyb）（预杂交）：在加入特异探针前用合适的大分子处理以饱和非特异性结合。
Primary structure（一级结构）：信息大分子单体的精确序列，如多肽或核酸。
Primer（引物）：短的预先存在的寡聚核苷酸链，在DNA聚合酶的作用下可以连接新的脱氧核糖核苷酸使DNA链延伸。
Probability（可能性）：可能性。
Probe（探针）：①核酸探针，一条可以被标记的核酸链，用于从核酸混合物中杂交互补的分子；②单一序列的短寡核苷酸，用作杂交探针鉴别病原物。
Prophage（原噬菌体）：当与宿主同步复制时，温和病毒的基因组状态通常是插入到宿主基因组内。
Protease［蛋白（水解）酶］：能够水解连接氨基酸肽键的酶，使蛋白质丧失活性。
Protocol（实验程序）：实验方法。
Protoplast（原生质体）：除去细胞壁的细胞。
Pulse（脉冲）：不连续的处理，通常间隔短暂的时间。
Pulsed field gel electrophoresis［脉冲（电）场凝胶电泳］：电场的方向周期性地改变，较大分子的DNA在新电场方向上重新排列需要更长的时间，因此不同大小的DNA片段可以被分开。
Quantum sufficient（q.s.）（定量）：一种足够的量，用于表示“定容到指定体积”，如

定量到 1000 ml。

Quaternary structure（四级结构）：蛋白质分子中最终形成蛋白质分子的各个多肽的数目和排列方式。

Quenching（猝灭）：由于重金属离子导致的荧光显微镜的荧光减弱。

Radioactivity（放射性）：原子的核内自然释放的微粒和/或电磁能，这样的释放可以显现和定量化，放射性可以用作标记。

Radioimmunoassay［放射免疫测定（分析）］：用放射性的抗体或抗原测定体液内特定物质的免疫学方法。

Radioisotope（放射性同位素）：能够通过自然衰变释放放射性粒子的某种元素的同位素。

Radiolabeled（放射性标记的）：一种分子连有放射性元素。

Radionucleotide（放射性核苷酸）：一种放射性标记的核苷酸。

Random priming（随机延伸）：一种通过使用随机引物在体外转录延伸标记核酸的方法。

Reagent（试剂）：一种能够以一定方式进行反应的化学物质，用作化学反应的组分。

Recombinant DNA（重组 DNA）：一种包含来自两种或更多来源的 DNA 分子。

Reducing agent（还原剂）：一种能够打开二硫键的化学物质。

Regulation（调控）：如诱导和阻遏等过程，控制蛋白质合成的速率。

Replacement vector（置换型载体）：一种克隆载体，如噬菌体，其中载体的一些 DNA 可以被外源 DNA 所置换。

Reporter gene（报告基因）：①一种基因被用作基因成功转移的指示器；②一种基因受到检测的 DNA 片段的调控。

Reprint request（影印件索取）：向论文作者索取论文的影印件。

Resolution（分辨率）：能够分辨的两点之间的最小距离。

Retrovirus［反（逆）转录病毒］：以单链 RNA 作为其遗传物质的病毒，在反转录酶的作用下可以合成互补 DNA。

Reverse osmosis（反渗透）：水被加压通过半透膜，截留盐和微粒将它们从水中除去。

Roentgen（伦琴）：离子化能力的单位，等于在 1ml 干燥空气中形成一个静电单位所需要的离子化的数目。

Run（运行）：①（名词）一个定时的实验或技术操作；②离心、快速液相层析或午饭时运行所获得的峰；③（动词）进行一次定时的实验或操作，如运行一次凝胶电泳。

Running buffer（电泳缓冲液）：凝胶电泳所用的缓冲液。

Safety can（安全罐）：易燃液体应该储存在能够控制可燃蒸气的容器内，根据职业安全与健康部门的规定，安全罐必须能够防漏、自动解除内部压力、充气或灌气后自动关闭。必须有一条黄色的标贴带贴在罐的周围，告知液体的燃点是或低于 26.7℃（80℉）。

Salt（盐）：一种可以通过用不同的阳离子替代酸的氢离子所形成的离子组分。

Scintillant（闪烁体）：对放射性产生反应而发光的荧光物质。

Scintillation counter（闪烁计数仪）：记录由放射性发散或化学反应产生的微弱光脉冲的仪器。

Secondary antibody（二级抗体）：抗体与一种已经结合抗原的抗体结合，常被用于识别或标记第一抗体。

Secondary structure（二级结构）：多肽或多核苷酸折叠的最初样式，通常是氢键结合的结果。

Secretion vector（分泌载体）：一种 DNA 载体，其蛋白质产物可以由细胞合成和分泌到胞外。

Section（切片）：为显微镜观察进行的样品切片。

Sediment（沉降）：使溶液中的颗粒脱离溶液并沉积到容器的底部，可以仅在重力的作用下或通过离心实现。

Selection（筛选）：将生物放在特别基因型喜好的培养基条件下生长，抗体筛选是最常见的方法。

Selective medium（选择培养基）：一种培养基对于一些特定微生物的生长要比其他类型的微生物要优先，如含抗生素的培养基只允许那些对抗生素有抗性的微生物生长。

Semipermeable memebrane（半透膜）：一种膜选择性地允许一些分子通过而阻止另一些分子透过，如溶剂可以通过特定的膜而蛋白质则不能通过。

Serology（血清学）：体外研究抗原-抗体反应的学科。

Serum（血清）：血细胞和引起凝结反应的物质被去除后血液的液体部分。

Sharpie：商标名称，常被用于永久性记号笔。

Sharps（尖利物品）：实验室任何尖利的物品必须小心处置，如针、巴斯德管、移液头等。

Significant（显著的）：当 P 值小于预期值时，一个实验结果在统计学上是明显的，但不意味着结果是重要的。

Site-directed mutagenesis（定点诱变）：一个不同的核苷酸通过合成 DNA 的方法在 DNA 分子上的特别位点插入。

Slide（玻片）：一片玻璃或塑料，上面可以固定组织或有机体进行染色和显微观察。

Smear（涂片）：将细胞涂布在显微玻片上，可以进行固定和染色。

Soap（肥皂）：脂肪酸的盐。

Southern blot（Southern 印迹）：一条单链核酸（DNA 或 RNA）与固定在膜上的 DNA 分子杂交。

Specific activity [比活（度、性）]：单位质量元素的放射活性。比活度愈高，分子的放射性活度愈高。

Spin（旋转）：离心。

Split（分开）：减少一个培养物中的细胞数目。

Spore（孢子）：通常指许多原核生物和真菌形成的抵抗环境的休眠结构。

Standard（标准）：一种公认的用于定量和定性分析的参比测定。

Standard curve（标准曲线）：已知物质的浓度对依赖浓度的底物性质（如 O.D.）所作的图。

Standard deviation（标准偏差）：方差的平方根，是衡量数据分布的值。

Standard unit（S.I.）（标准单位）：单位的国际系统，依赖于 7 种基本量。

Stationary phase（稳定期）：种群生长周期中处于生长停止的时期。

Sterile（无菌的）：没有活有机体或病毒。

Sticky ends（黏端）：带有短的单链悬挂的 DNA 分子的末端。

Stock［储存（液）］：实验室试剂的主要来源。实验室储存液是大量购自于公司的瓶装试剂，你的储存液是你自己配制的溶液。

Stoichiometry（化学计量）：化学反应中反应物与产物间的数量关系。

Strain［株（系）］：有特殊标记或性质的一个种的来源。

Subculture［继（传）代培养（物）］：分开细胞培养物加入新的培养基。

Substrate（reaction and culture）（底物）（反应或培养）：①酶用作反应物的分子或离子；②液体培养基中提供给细胞的营养物质。

Substratum（基底）：提供给细胞接触或生长的表面。

Supercoil（超螺旋）：环状 DNA 的高度缠绕。

Supernatant（上清）：离心后沉淀物上面的液体部分。

Supplies（供给）：需要的物品。

Survey（调查）：一种全面的显示极端或界限的考查方法。

Svedberg value or Svedberg constant，S value（Svedberg 值或 Svedberg 常数、沉降系数、S 值）：一种沉降系数，颗粒在离心场中的速度。

Synergistic effect（协同效应）：A 处理的结果与 B 处理的结果加在一起要比单独 A 或 B 处理的结果要大或者不同，表明 A 和 B 通过不同的途径发挥作用。

t-Test（t 检验）：检验值在正态分布曲线上。

Tare［（称）皮重］：为了获得物质的净重，通过物质加容器的重量减去容器的重量方法获得。

TCA precipitation（TCA 沉淀）：使用 TCA 促使蛋白质或核酸由溶液中析出，这样通常会破坏这些物质，对特定物质定量时才这么做。

Telnet（远程登录）：将你的计算机与原处的计算机连接。

Template（模板）：一种分子模式被用于合成另一个分子。

Teratogen（致畸剂）：能干扰正常胚胎发育的物质。

Tertiary structure（三级结构）：一种多肽链在二级结构的基础上的最终折叠结构。

Theory（理论）：为某种争论所假定的一种假说，是对一系列实验结果的不完全的试验性解释。

Titer（滴度、效价）：①测定抗体的量，通常给出的形式如 1/4000；②能养活的细菌数目；③样品中通过噬菌斑数目测定的噬菌体数量。

Titration（滴定）：两种试剂混合，其中一个知道浓度而另外一个不知道浓度，有一些方法可以指示两种试剂已经完全反应。

Toxic（有毒的）：在一定剂量下可能致死的物质。

Toxic chemicals（有毒物质）：能明显引起人类疾病的物质。

Tracking dye（示踪染料）：有特定分子质量的染料，可以用于跟踪电泳过程。

Trans（反式、跨、穿）：①与以双键连接的两个碳原子上连接的基团分布在双键的相反方向；②基团存在于复合物的一个和另一个亚基之间；③由亚基的另一侧参与引起的

效应。

Transduction（转导）：通过病毒（或噬菌体）颗粒转移宿主的遗传信息。

Transfection（转染）：①通过病毒上的 DNA 或 RNA 转化一个原核细胞；②真核细胞中的遗传转化过程。

Transfer（转移）：将一个容器中一定体积的液体转移到另一个容器中。

Transformation（转化）：①遗传信息通过游离 DNA 转移到一个原核细胞；②由特定病毒感染引起的使常规的动物细胞转变为一个癌细胞。

Transgenic（转基因的）：通过重组 DNA 技术使动物体或植物体在遗传上带有外源基因的插入。

Transmittance（透光度）：测定光透过物质的量。

Transposable element（转座因子）：一种遗传因子有从染色体的一个位点移到另一个位点的能力。

Transposition［转座（作用）］：一段 DNA 围绕染色体的移动，通常通过转座因子的作用实现。

Transposon（转座子）：一种可以转座的因子，除与基因的转座有关外，还可以携带其他基因。这些基因通常带有选择表型，如抗生素抗性。

Trial run（试验）：一个试验性的实验。

Tritium（氚）：氢原子的同位素^{3}H，原子核有 2 个中子。

Troubleshooting（发现和处理故障）：查出问题的原因并知道如何处理。

Trunnion（耳轴）：扣牢旋转转子使离心管套一起旋转。

Trypsin（胰蛋白酶）：一种蛋白水解酶，用于将基底贴壁的细胞悬浮，可以在精氨酸和赖氨酸的羧基端水解肽键。

Tungsten filament lamp（钨丝灯）：分光光度计上用于产生白光（含有所有眼睛可见的波长）的光源。

Two-hybrid system（双杂交系统）：在酵母体内用于检测蛋白质相互作用的系统。

Upstream position（上游位置）：DNA 或 RNA 分子上的 5′端的核酸序列。

UV box（紫外光盒）：透射光。

Variability（变异性）：观察样本数据间有多少差异，通常用范围、标准偏差和方差来测定。

Variance（方差）：数据离散的测定，方差是平均值的平均平方差。

Vector（载体）：质粒或病毒用于遗传工程中基因的插入和进入细胞，昆虫或其他动物中可以将病原从一种宿主带到另外一个宿主的物质。

Viable（生存的）：活的能够增殖的。

Viable count（活细胞计数）：微生物种群中测定活细胞的浓度。

Virulence（毒力）：寄生物致病的程度。

Virus（病毒）：含有 DNA 或 RNA 遗传因子能够在细胞内和细胞外之间存在，后者是一种感染状态。

Volatility（挥发性）：一种液体或固体在一定温度下成为蒸气的倾向性。

Warm room（暖房）：房间加热到一定温度用作培养。

Wash（洗）：对于液体，除去上清用“新”的液体悬浮后离心。

Well（样品孔）：凝胶用于上样的孔。

Western blot（Western 印迹）：见免疫印迹。

Wet mount（湿黏附）：湿的样品黏附到显微镜的玻片上。

Wild type（野生型）：由自然界分离到的生物，基因通常和天然的形式相同。

Window（段）：一个特别度量的范围，如波长段、时间段或光谱段。

Wobble（摆动）：允许反密码子和密码子的第三个位置的碱基进行非标准配对的概念。

Working distance（工作距离）：物镜到盖玻片之间的距离。

World Wide Web（WWW）（万维网）：通过超文本链接，读者可以直接在因特网上阅读另一个文件。

X-gal（5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷）：β 半乳糖苷酶的体外底物。

X-ray（X 射线）：一种高能量的光的形式，有足够的能量去离子化内部电子。

Zwitterion［两（兼）性离子］：一个分子有带正电的基团也有带负电的基团，也称两性电解质或双极性离子。